

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra Fyziologie



Metabolické účinky chronického podávání metforminu u obézních myší v závislosti na složení vysokotukové diety.

Metabolic effects of chronic metformin administration in obese mice
depending on the composition of high-fat diet.

Diplomová práce

Jana Roubalová

Praha 2011

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Martin Rossmeisl, Ph.D.

Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Oddělení biologie tukové tkáně

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Martina Rossmeisla, Ph.D. ve Fyziologickém ústavu Akademie věd České Republiky za použití dále uvedené literatury. Dále prohlašuji že jsem tuto práci ani žádnou její část nepoužila ke získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 1.4.2011

Jana Roubalová

.....

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli MUDr. Martinu Rossmeislovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Janu Kopeckému, DrSc., vedoucímu oddělení biologie tukové tkáně, a všem ostatním členům laboratoře za ochotu, pomoc i přátelské prostředí v laboratoři. Mgr. Kristíně Bardové bych ráda poděkovala za histologické zpracování vzorků v rámci mé diplomové práce. V neposlední řadě děkuji i své rodině, která mi po dobu studia poskytla pevné a příjemné zázemí.

Abstrakt

Obezita je spojena s rozvojem mnoha závažných metabolických poruch, jako jsou například dyslipidémie, inzulinová rezistence, ukládání ektopického tuku v játrech a ve svalech, jaterní steatóza a nakonec také diabetes 2. typu. Nejpoužívanějším preparátem k léčbě a prevenci těchto onemocnění je metformin (1,1-dimetylbiguanid), který stimuluje vstup glukózy do buňky bez potřeby sekrece inzulinu a normalizuje hladiny lipidových metabolitů v plasmě.

Výzkum této problematiky na laboratorních zvířatech je často spojen s indukcí obezity pomocí vysokokalorických diet. V této práci jsem se zabývala porovnáním metabolických účinků diet HFD a HSD, jejichž hlavní obezitogenní složkou je tuk, který tvoří 60 % energetického obsahu. Dieta HFD obsahovala především n-6 nenasycené mastné kyseliny a škrob (100% glukóza). Dieta HSD obsahovala vepřové sádlo, tedy více nasycených mastných kyselin, a sacharózu (50% glukóza, 50% fruktóza). Dále jsem studovala účinky chronického podávání metforminu v pitné vodě na metabolismus myši krmených těmito dietami.

Metody: Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT), stanovení obsahu lipidových metabolitů v plasmě a ve tkáni, radio-imunologické stanovení obsahu inzulinu v plasmě, stanovení aktivity AMPK metodou „western blotting“

Výsledky: Při konzumaci diety HSD byla zvýšena spotřeba potravy, což přispělo k silnějšímu rozvoji obezity a s ní spojených metabolických poruch. Dieta HSD pravděpodobně stimulovala proces lipogeneze, což vedlo k silnějšímu rozvoji inzulinové rezistence a výraznému ukládání ektopického tuku především v játrech. Z výsledků IPGTT lze usuzovat, že dieta HSD sice indukovala silnější inzulinovou rezistenci, ale zároveň stimulovala intenzivnější sekreci inzulinu z buněk pankreatu. Dieta HSD se tak ukázala jako účinnější obezitogenní činidlo, než dieta HFD.

Metformin měl silný anorexigenní účinek na myši konzumující dietu HFD, nikoliv však na myši konzumující dietu HSD. Většina benefičních účinků na metabolismus vyplývala pouze ze změn v příjmu potravy a následného poklesu tělesné hmotnosti. Z přímých účinků metforminu jsme prokázali pouze snížení hladiny inzulinu v krvi a akumulace TAG v játrech. Z těchto důvodů jsme metodu dlouhodobé aplikace metforminu v pitné vodě označili pro využití v laboratorní praxi jako nevhodnou.

Klíčová slova: Inzulinová rezistence, metformin, vysokotuková dieta, inzulin, obezita

Abstract

Obesity leads to many severe metabolic disorders, e.g. dyslipidemia, insulin resistance, ectopic fat accumulation in the liver and skeletal muscles, non-alcoholic fatty liver disease and finally diabetes mellitus type 2. Metformin (1,1-dimethylbiguanide) is the most favored medicament for the treatment and prevention of these disorders. It stimulates cellular glucose uptake and normalizes blood levels of lipid metabolites without triggering insulin secretion.

Research on insulin resistance and diabetes is often realized through developing diet-induced obesity in laboratory animals. The aim of this project is to compare metabolic effects of two different high-fat diets named HFD and HSD. The HFD diet consists chiefly of n-6 polyunsaturated fatty acids (corn oil) and starch (100% glucose). The HSD diet contains mainly saturated fatty acids (lard) and sucrose (50% glucose and 50% fructose). I also studied metabolic effects of metformin by adding it continuously to the drinking water given to obese mice fed with the HFD or the HSD diet.

Methods: Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT), blood and tissue levels of lipid metabolites assessment, radio-immunological assessment of blood levels of insulin, assessment of AMPK activity in liver by western blotting.

Results: Increased consumption of the HSD diet led to predominant development of obesity and associated metabolic disorders. The HSD diet presumably stimulated lipogenesis in the liver causing significant progress of insulin resistance and ectopic fat accumulation in the liver. The IPGTT results suggest that the HSD diet also induced more intense insulin secretion from the pancreatic β -cells. To summarize the obesogenic potential of the HSD diet was higher compared to the HFD diet.

Adding metformin to the drinking water had a strong anorexigenic effect on mice consuming the HFD diet, but not on the ones consuming the HSD diet. Most of detected beneficial metabolic effects resulted from the body weight loss, which was mainly caused by decline of the diet consumption. The direct effect of metformin was only the decrease of the blood level of insulin and TAG accumulation in the liver. For these reasons I concluded this method as inappropriate for laboratory use.

Key words: Insulin resistance, metformin, high-fat diet, insulin, obesity

Obsah

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Seznam zkratk | 8 | |
| Úvod | 9 | |
| 1 | Literární úvod | 11 |
| 1.1 | Metabolické poruchy spojené s obezitou | 11 |
| 1.1.1 | Adipogeneze a ukládání tuku v organismu | 11 |
| 1.1.1.1 | Evoluční význam adipogeneze | 11 |
| 1.1.1.2 | Obezita | 12 |
| 1.1.1.3 | Benigní vs. maligní obezita | 13 |
| 1.1.2 | Inzulínová rezistence..... | 16 |
| 1.1.2.1 | Vznik inzulínové rezistence | 16 |
| 1.1.2.1.1 | Vliv volných mastných kyselin | 17 |
| 1.1.2.1.2 | Vliv toxických lipidových metabolitů..... | 19 |
| 1.1.2.1.3 | Vliv chronického zánětu v tukové tkáni..... | 22 |
| 1.1.2.2 | Projevy inzulínové rezistence v jednotlivých tkáních..... | 25 |
| 1.1.3 | Metabolický syndrom..... | 28 |
| 1.1.4 | Onemocnění spojená s ukládáním tuku v játrech | 29 |
| 1.1.5 | Diabetes mellitus 2. typu..... | 31 |
| 1.1.6 | Strategie v léčbě diabetu | 32 |
| 1.2 | Metformin..... | 34 |
| 1.2.1 | Molekulární mechanismus působení metforminu..... | 35 |
| 1.2.1.1 | Jakým způsobem metformin aktivuje AMPK? | 36 |
| 1.2.1.2 | AMPK v signalizační dráze metforminu..... | 37 |
| 1.2.1.3 | Mechanismy nezávislé na AMPK..... | 38 |
| 1.2.2 | Účinky metforminu na energetický metabolismus | 38 |
| 1.2.2.1 | Vliv na glykémii | 38 |
| 1.2.2.2 | Vliv na lipidový metabolismus..... | 41 |
| 2 | Cíle diplomové práce..... | 43 |
| 3 | Metody..... | 44 |
| 3.1 | Práce s laboratorními zvířaty..... | 44 |
| 3.1.1 | Experimentální diety..... | 45 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2 | Standardní laboratorní metody | 47 |
| 3.2.1 | Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT) | 47 |
| 3.2.2 | Odběry krve v hladovém a postprandiálním stavu | 48 |
| 3.2.3 | Stanovení obsahu lipidů v plasmě a ve tkáni..... | 49 |
| 3.2.4 | Stanovení obsahu inzulínu v plasmě..... | 51 |
| 3.2.5 | Stanovení aktivity ACC a AMPK v jaterní tkáni | 53 |
| 3.2.5.1 | Odběr tkáně metodou „freeze clamp“ | 54 |
| 3.2.5.2 | Izolace proteinů..... | 54 |
| 3.2.5.3 | stanovení obsahu proteinů metodou BCA..... | 56 |
| 3.2.5.4 | Gelová elektroforéza | 58 |
| 3.2.5.5 | „Western blotting“ | 59 |
| 3.3 | Statistické vyhodnocení výsledků..... | 63 |
| 4 | Výsledky | 64 |
| 4.1 | Pokus č.1: Porovnání metabolických účinků diet HFD a HSD..... | 64 |
| 4.1.1 | Spotřeba diety a nárůst tělesné hmotnosti | 64 |
| 4.1.2 | Posouzení míry glukózové tolerance metodou IPGTT | 65 |
| 4.1.3 | Analýza tkání..... | 67 |
| 4.1.4 | Stanovení obsahu lipidových metabolitů v plasmě..... | 69 |
| 4.2 | Pokus č. 2: Porovnání účinků různých dávek metforminu na pozadí diet HFD a HSD | 70 |
| 4.2.1 | Stanovení skutečné dávky metforminu | 71 |
| 4.2.2 | Spotřeba diety a nárůst tělesné hmotnosti | 73 |
| 4.2.3 | Posouzení míry glukózové tolerance metodou IPGTT | 77 |
| 4.2.4 | Stanovení obsahu inzulínu v plasmě..... | 77 |
| 4.2.5 | Porovnání obsahu lipidových metabolitů v odlišných nutričních stavech | 79 |
| 4.2.6 | Analýza tkání..... | 81 |
| 4.2.7 | Stanovení aktivity AMPK v jaterní tkáni..... | 84 |
| 5 | Diskuse..... | 85 |
| 6 | Závěr..... | 93 |
| 7 | Seznam použité literatury | 94 |

Seznam zkratek

| | |
|--------------|---|
| ACC | Acetyl-CoA-karboxyláza (<i>Acetyl-CoA-carboxylase</i>) |
| AICAR | 5-aminoimidazol-4-karboxamidribotid |
| AMPK | 5'adenosin-monofosfát aktivovaná proteinkináza |
| BMI | Body mass index |
| CPT1 | Karnitinpalmitoyltransferáza 1 |
| DAG | Diacylglycerol |
| FAS | Syntáza mastných kyselin (<i>Fatty acid synthase</i>) |
| FBG | Glykémie nalačno (<i>Fasting blood glucose</i>) |
| FFA | Volná mastná kyselina (<i>Free fatty acid</i>) |
| GLUT4 | Glukózový přenašeč 4 (<i>Glucose transporter 4</i>) |
| HDL | Lipoprotein s vysokou hustotou (<i>High-density lipoprotein</i>) |
| HFD | Vysokotuková dieta (<i>High-fat diet</i>) |
| HSD | Dieta s vysokým obsahem sacharózy (<i>High sucrose diet</i>) |
| HSL | Hormonsenzitivní lipáza (<i>Hormone-sensitive lipase</i>) |
| IPGTT | Intraperitoneální glukózový toleranční test |
| IRS-1 | Inzulínový receptorový substrát 1 (<i>Insulin receptor substrate 1</i>) |
| LCFA | Mastná kyselina s dlouhým řetězcem (<i>Long-chain fatty acid</i>) |
| LDL | Lipoprotein s nízkou hustotou (<i>Low density lipoprotein</i>) |
| LPL | Lipoproteinlipáza (<i>Lipoprotein lipase</i>) |
| MCD | Malonyl-CoA-dekarboxyláza (<i>Malonyl-CoA-decarboxylase</i>) |
| NAFLD | Nealkoholická jaterní steatóza (<i>Non-alkoholic fatty liver disease</i>) |
| NASH | Nealkoholická steatohepatitis (<i>Non-alkoholic steatohepatitis</i>) |
| PPAR | Peroxisome Proliferator Activated Receptor |
| PKC | Proteinkináza C (<i>Protein kinase C</i>) |
| ROS | Kyslíkové radikály (<i>Reactive oxygen species</i>) |
| RQ | Respirační koeficient (<i>Respiratory quotient</i>) |
| T2DM | Diabetes mellitus 2. typu (<i>Type 2 Diabetes mellitus</i>) |
| TAG | Triacylglycerol |
| TLR | Toll-like receptor |
| TNF α | Tumor necrosis factor α |
| VLDL | Lipoprotein s velmi nízkou hustotou (<i>Very low-density lipoprotein</i>) |
| WHO | Světová zdravotnická organizace (<i>World health organization</i>) |

Úvod

Tvorba tukových zásob má pro náš organismus zcela zásadní fyziologický a evoluční význam. Nadměrné hromadění tuku, které vede k obezitě, může naopak způsobit vážné zdravotní komplikace, snižuje kvalitu života a může i výrazně zkrátit jeho délku. Současný životní styl, který je spojen s nadměrným přísunem kalorií, nedostatkem fyzické aktivity a zvýšenou stresovou zátěží, podporuje šíření obezity ve všech vyspělých zemích světa, a to tak rychle, že se začíná mluvit o „pandemii obezity“, ačkoliv se nejedná o infekční onemocnění. Nejčastější příčinou úmrtí v těchto státech zůstávají kardiovaskulární poruchy, na jejichž rozvoji se ovšem obezita zásadním způsobem podílí.

Velmi závažným důsledkem obezity může být rozvoj diabetu 2. typu. Primární příčinou vzniku tohoto onemocnění není dysfunkce pankreatických buněk spojená s nedostatečnou sekrecí inzulínu, jako je tomu u diabetu 1. typu, ale snížená odpověď organismu k účinkům inzulínu, kterou známe pod pojmem inzulínová rezistence. K rozvoji této metabolické poruchy mohou vést genetické předpoklady, častěji ji ale způsobuje nezdravý životní styl a neléčená obezita.

Na trhu je pro léčbu diabetu k dispozici značné množství preparátů. Většina z nich, včetně nejznámějšího léku – inzulínu, však léčí pouze symptomy tohoto onemocnění, navíc je jejich užívání spojeno se značným množstvím nežádoucích vedlejších účinků a postupným snižováním léčebného efektu, které je nutné kompenzovat průběžným navyšováním dávky. Jediným lékem, který dokáže potlačit samotnou příčinu onemocnění a může tak být využit k účinné prevenci, je metformin. Proto je jakožto „lék první volby“ předepisován nejen diabetikům, ale především pacientům, u kterých je riziko rozvoje diabetu zvýšené a u kterých se vyskytují některé známky inzulínové rezistence.

Inzulínová rezistence je fenoménem moderní doby, jehož výzkumem se zabývá nesčetné množství laboratoří po celém světě. Příčiny jejího vzniku i její dopady na organismus jsou ale tak složité a komplikované, že se ještě zdaleka nepodařilo proniknout do všech detailů. Přitom by důkladné poznání všech těchto mechanismů mohlo vést k rozvoji nových léčiv, spolehlivých diagnostických prostředků a k zastavení, nebo alespoň zpomalení pandemického šíření obezity a diabetu. V oblasti výzkumu inzulínové rezistence stále hrají důležitou roli laboratorní zvířata, u kterých je často indukován rozvoj obezity a s ní spojených komplikací pomocí různých vysokokalorických diet. Metabolickými účinky dvou takových diet se zabývá i tato práce. Konkrétně se jedná o vysokotukové diety lišící se kompozicí mastných kyselin a cukrů. Cílem mé diplomové práce byla charakterizace účinků těchto experimentálních diet na energetický metabolismus a dále posouzení jejich obezitogenního potenciálu.

Dalším cílem této práce bylo studium chronického účinku metforminu u laboratorních myší v rámci dlouhodobého pokusu, což je přístup, který byl doposud v literatuře popisován velmi sporadicky. Tento model by umožnil srovnávat působení

nejrůznějších antidiabetických látek v kombinaci s metforminem, což je velice důležité z hlediska potenciálního uplatnění takové látky v klinické praxi, kde naprostá většina cílových pacientů metformin užívá.

V následujícím textu jsou popsány základní patofyziologické mechanismy, které obezitu a diabetes 2. typu spojují. Konkrétně je pojednáno o tom, jak nadváha přechází v obezitu, obezita v metabolický syndrom a ten nakonec v diabetes 2. typu. Jak bude z tohoto pojednání zřejmé, informací na toto téma již známe hodně, nicméně v našem poznání stále existují zásadní mezery, které představují prostor pro další a navíc velice potřebné vědecké bádání.

1 Literární přehled

1.1 Metabolické poruchy spojené s obezitou

1.1.1 Adipogeneze a ukládání tuků v organismu

1.1.1.1 Evoluční a fyziologický význam adipogeneze

Kdyby náš organismus nebyl schopen ukládat energii ve formě triacylglycerolů (TAG) v tukové tkáni, byli bychom nuceni přijímat potravu nepřetržitě a navíc úměrně okamžitému výdeji energie, což si lze jen těžko představit. Přítomnost tukových zásob nám tedy umožňuje přijímat potravu v oddělených dávkách a být aktivní i v době, kdy potravu nepřijímáme. Navíc díky tukovým zásobám dokážeme přežít i poměrně dlouhá období hladu. Není tedy divu, že po příjmu potravy, ať už se jedná o tuky, cukry, nebo bílkoviny, je značná část energetických substrátů, například glukóza a mastné kyseliny, přeměněna v procesu lipogeneze na TAG a posléze uložena ve formě tukových zásob ¹.

Ačkoliv je převod různých substrátů na TAG energeticky náročný, je pro organismus v době dostatku energie velmi výhodný. TAG představují na jednotku hmotnosti energeticky nejbohatší substrát (39 kJ/g), navíc se jedná o nepolární molekuly, které na rozdíl od glykogenu nemají tendenci vázat na sebe vodu a tak zbytečně navyšovat hmotnost jedince bez současného navyšování energetického potenciálu ².

Dalším fyziologickým významem ukládání tuků do tukových dep je ochrana proti lipotoxicitě FFA. Za normálních podmínek je těchto molekul v oběhu velice málo. Zvýšenou hladinu můžeme pozorovat jen v období hladu, kdy dochází k lipolitickému štěpení TAG a uvolňování FFA do krevního oběhu. Ty jsou dále metabolizovány ve tkáních jako bohatý zdroj energie. V sytém stavu je většina FFA ve formě TAG nebo esterů cholesterolu vázána v různých lipoproteinových částicích, především v chylomikronech a VLDL (very low-density lipoprotein). Uvolněné FFA jsou spotřebovány za zisku energie v procesu β -oxidace mastných kyselin, nebo reesterifikovány zpět na TAG. Zvýšená hladina FFA v oběhu narušuje signální kaskády mnoha hormonů a přispívá ke zvýšené tvorbě lipotoxických metabolitů, jak bude podrobněji popsáno dále. Buňky tukových dep, zvané adipocyty, jsou adaptovány na to, aby FFA ve formě neutrálních molekul TAG bezpečně uschovaly, aniž by docházelo k nežádoucím lipotoxickým projevům ³.

Tuková tkáň disponuje kromě velkého úložného prostoru pro TAG také složitým systémem hormonální regulace, který umožňuje energii v době energetického nadbytku skladovat a v době hladu distribuovat do ostatních tkání. Sekretuje řadu vlastních hormonů

(adipokinů), z nichž některé řídí výhradně procesy spojené s energetickou homeostázou, jiné pak regulují systémové procesy, jako je například růst, reprodukce nebo imunita.

Tuková tkáň má samozřejmě i další fyziologické funkce, jako jsou například termogeneze nebo mechanická ochrana vnitřních orgánů. Tyto aspekty zde však v souvislosti s metabolickými poruchami diskutovány nebudou.

1.1.1.2 Obezita

Obezita, neboli nadměrné ukládání tukových zásob, představuje v civilizovaném světě velmi závažný a laickou veřejností stále často podceňovaný problém. Míru obezity můžeme klasifikovat pomocí takzvaného „body mass indexu“ (BMI), který vyjadřuje podíl váhy a druhé mocniny výšky ($BMI = \text{hmotnost [kg]} / \text{výška [m]}^2$). V důsledku současného životního stylu, kdy zvýšená nabídka kalorií v potravě neodpovídá sníženým nárokům na fyzickou aktivitu, se obezita pandemicky šíří. Podle statistik světové zdravotnické organizace (WHO) trpí v České Republice obezitou ($BMI > 30$) přibližně 23 % dospělých. Nadváha ($BMI > 25$) se však týká již více než poloviny české populace ⁴.

Obezita je důsledkem nerovnováhy mezi příjmem a výdejem energie. Na jejím počátku je genetická predispozice nebo častěji nezdravé životní a stravovací návyky ⁵. Nadměrný příjem nutrientů se nejprve projeví zvýšeným ukládáním TAG do podkožních (subkutánních) tukových dep, což vede ke zvyšování tělesné hmotnosti a posléze k rozvoji závažných metabolických komplikací, jako je například ukládání tuku mimo tuková depa, hormonální rezistence, lipotoxicita a další ^{2,6,7}.

Ukládání tělesného tuku a příjem energie reguluje leptin, anorexigenní hormon vylučovaný adipocyty v míře úměrné velikosti tukových buněk a množství tukové tkáně ^{5,8}. Čím větší je tedy podkožní tukové depo, tím více leptinu je sekretováno do krve a transportováno k cílovým periferním orgánům, nebo přes hematoencefalickou bariéru do hypothalamu ⁹. Zde leptin působí na nejrozličnější hypothalamická jádra a reguluje mnoho biologických procesů včetně růstu a reprodukce. Z hlediska rozvoje obezity je ale nejdůležitější vazba na leptinové receptory (ObR) v nucleu arctuatu (ARC) a ventromediálním jádru hypothalamu (VMH), čímž leptin stimuluje takzvané „POMC neurony“ k výlevu melanocyty stimulujícího hormonu α (α -MSH) a naopak inhibuje výlev orexigenního neuropeptidu Y (NPY) z tzv. „AgRP neuronů“. Na centrální úrovni je tak činnost leptinu regulována tělesná hmotnost, stimulován výdej kalorií a tlumen příjem potravy ^{8,10}.

Leptinová rezistence: Při nadměrném ukládání tuků hladina leptinu v krvi přesahuje fyziologickou koncentraci a zatím neznámým způsobem dochází k rozvoji leptinové rezistence na periferii i v centrální nervové soustavě organismu ¹⁰. Tato rezistence je

charakterizována stavem, kdy fyziologická koncentrace leptinu v krvi vyvolá sníženou biologickou odpověď. V důsledku snížené odpovědi hypotalamu na leptin dochází k hyperfagii, snížení kalorického výdeje a k nadměrnému zvětšování tukových zásob⁹.

Velkou komplikací je rozvoj leptinové rezistence na periferní úrovni.

Za normálních okolností leptin v netukových orgánech stimuluje β -oxidaci mastných kyselin, čímž chrání například játra, kosterní a srdeční svalstvo nebo pankreas před ukládáním takzvaného ektopického tuku^{11,12}. V těchto tkáních leptin působí jako endogenní agonista nukleárního receptoru PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α), který je faktorem regulujícím transkripci genů spojených právě s β -oxidací mastných kyselin¹³. V adipocytech subkutánní tukové tkáně je tato aktivita leptinu specificky blokována¹⁴, čímž dochází k přednostní aktivaci dalšího ze členů rodiny PPAR nukleárních receptorů - PPAR γ . Tento transkripční faktor pro změnu stimuluje proliferaci a dozrávání adipocytů, *de novo* syntézu FFA, reesterifikaci FFA na glycerol, vstup FFA do buňky a další procesy spojené s adipogenezí a ukládáním tukových zásob².

Kapacita pro ukládání tukové tkáně je omezená. Při nadměrném příjmu potravy, který může být navíc provázen leptinovou rezistencí, dochází nejprve k hyperplasii neboli zmnožení adipocytů. Po dosažení určitého limitního počtu se adipocyty mohou dále pouze zvětšovat (hypertrofie). Hyperplasie je způsob navyšování kapacity typický především pro subkutánní tuková depa (viz dále). Kapacita viscerálního tukového depa se naopak zvyšuje přednostně hypertrofií adipocytů. Hypertrofické adipocyty sekretují do krevního oběhu větší množství leptinu, FFA i prozánětlivých cytokinů¹⁵. TAG se v první řadě ukládají do subkutánních tukových dep, po překročení kapacity expandují do dep viscerálních (viz dále) a nakonec také do netukových orgánů, které nedisponují schopností odolávat lipotoxicitě v té míře, jako adipocyty¹⁶. V tuto chvíli se organismus ocitá na prahu mnohem závažnějších metabolických komplikací, které se souhrnně označují jako metabolický syndrom nebo také Syndrom X, a jejichž hlavním pojítkem je inzulínová rezistence (viz dále).

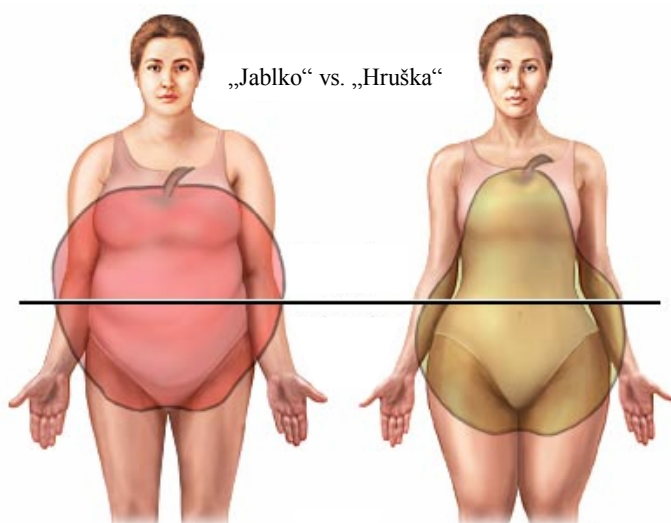
1.1.1.3 Benigní vs. maligní obezita

Jak již bylo naznačeno v předchozím textu, v souvislosti s lokalizací tukových zásob rozlišujeme tuková depa podkožní (subkutánní) a viscerální. V podkoží se tuk ukládá do metabolicky aktivnější hluboké vrstvy a do vrstvy povrchové. Viscerální tuk pak rozdělujeme na intraperitoneální a retroperitoneální (obklopuje ledviny a nadledvinky, představuje menšinu viscerálního tuku). Mezi intraperitoneální viscerální tuková depa pak patří depo omentální (poblíž žaludku a pobřišnice), mesenterické (obklopující střeva) a epigonadální (obklopující pohlavní orgány)².

Viscerální tuková depa jsou obecně metabolicky aktivnější, což se projevuje především sekrecí většího množství leptinu a ostatních adipokinů, včetně prozánětlivých

cytokinů (viz dále) ¹⁷⁻¹⁹. Navíc jsou napojena na portální krevní oběh, díky čemuž jsou přímo spojena s játry a mohou tak intenzivně ovlivňovat jejich metabolismus ²⁰.

Již v roce 1983 ukázal Hart a spol., že lokalizace tukových zásob v abdominálních partiích u žen 10x zvyšuje pravděpodobnost rozvoje diabetu 2. typu ²¹. Dnes je již zcela běžné rozlišovat obezitu periferní, kdy se tuk ukládá především do subkutánních tukových dep v oblasti hýždí a končetin, a obezitu centrální, kdy jsou hlavním úložištěm naopak viscerální tuková depa v břišní dutině. V praxi se tyto dva typy odlišují podle poměru obvodu boků a pasu. To, že centrální typ obezity znamená větší riziko rozvoje diabetu a kardiovaskulárních poruch, bylo již mnohokrát ukázáno v rámci nejrozličnějších klinických studií ^{7,19}, proto byl tento typ obezity označen jako „maligní“ a v některých zemích se stal jedním z kritérií pro diagnózu metabolického syndromu (viz dále). K ukládání tuků do centrální oblasti dochází častěji u mužů, protože je u nich geneticky kódovaná menší velikost subkutánních tukových dep, a dále u žen po menopauze, u kterých klesá hladina pohlavních hormonů. K preferenci viscerálního tukového depa pak obecně dochází při excesivním celotělovém ukládání tuku následkem leptinové resistance, v důsledku různých metabolických poruch, nebo následkem medikace (např. glukokortikoidy). Důležitou roli hraje také genetická predispozice ²².



Obr.1: Centrální a periferní obezita

Typ „jablko“ představuje obezitu centrální, nebo jinak řečeno abdominální, zatímco typ „hruška“ představuje benigní periferní typ obezity.

Převzato z

www.whartonmedicalclinic.com

Příčinné spojení centrální obezity a výskytu kardiovaskulárních a metabolických poruch se stalo téměř paradigmatem. Nyní se však ukazuje, že bude možná toto paradigma potřeba změnit, nebo minimálně upravit ^{7,23}. Ne všichni obézní jedinci jsou inzulinorezistentní, a naopak, ne všichni inzulinorezistentní jsou navenek obézní, a to i když vezmeme v potaz pouze obezitu centrální.

Fakt, který byl pozorován v rámci klinických studií, a sice že výskyt centrální obezity znamená zvýšené riziko zmíněných onemocnění, byl vysvětlován několika hypotézami: 1) Jednou z hlavních příčin rozvoje inzulinové resistance je zvýšený obsah FFA v krvi ²⁴. 2) Viscerální adipocyty vykazují *in vitro* vyšší lipolytickou aktivitu než

adipocyty subkutánní a mohly by tak přispívat větší měrou ke zvýšení hladiny FFA v krvi²⁵. 3) Mastné kyseliny se z viscerálního tukového depa uvolňují přímo do portálního oběhu, kde je jejich koncentrace vyšší než v systémovém oběhu. Z portálního oběhu jsou transportovány přímo do jater, kde působí lipotoxicky na jaterní buňky²⁰.

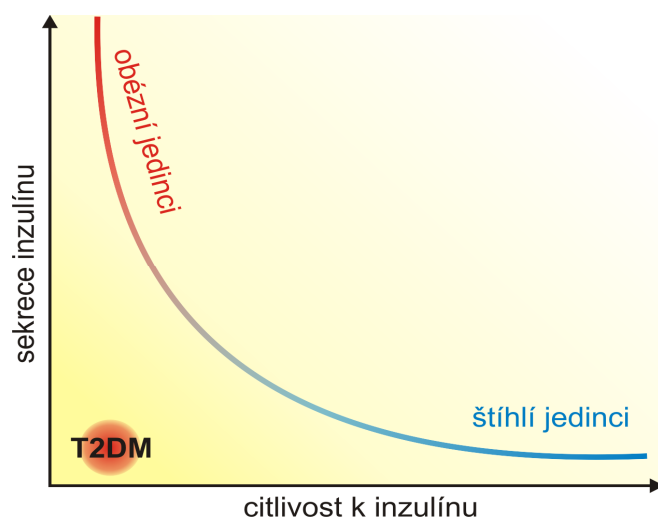
Nový pohled na toto téma přinesly moderní zobrazovací techniky, jako je nukleární magnetická rezonance (NMRI), nebo počítačová tomografie (CT), které nahradily měření obvodu pasu a boků při stanovení velikosti viscerálního tukového depa. Ukázalo se, že velikost viscerálního tukového depa je oproti velikosti subkutánního tukového depa velice malá, a že je tudíž velmi nepravděpodobné, aby viscerální tukové depo přispívalo hlavní mírou ke zvýšené hladině FFA v krvi²³. Většina současných klinických studií navíc s použitím modernějších statistických metod prokázala, že centrální a periferní typ obezity představují dva nezávislé rizikové faktory v rozvoji zmíněných onemocnění a že nárůst viscerálního tukového depa je většinou doprovázen i úměrným nárůstem tuku subkutánního, takže je poměrně těžké tyto faktory oddělit^{17,18}. Dále se také ukazuje, že lipolytická aktivita *in vivo* závisí ve stavu inzulínové rezistence především na velikosti adipocytů a tukového depa, spíše než na typu tukové tkáně²⁶. Faktem ale zůstává, že viscerální tuková depa jsou méně citlivá vůči inhibičnímu účinku inzulínu na lipolýzu, takže u zdravých jedinců vykazují skutečně vyšší lipolytickou aktivitu na jednotku hmotnosti^{27,28}.

Při hledání faktorů, které by lépe predikovaly rozvoj metabolických poruch, vedoucích například k diabetu nebo kardiovaskulárnímu onemocnění, bylo zjištěno, že tato rizika výrazně korelují s množstvím ektopického tuku například ve svalech. Tvorba ektopického tuku není podmíněna přítomností centrální obezity, ačkoliv její přítomnost riziko ukládání ektopického tuku zvyšuje^{7,29}. Mnoho lékařů se nyní přiklání k názoru, že spolehlivým ukazatelem maligní obezity, která představuje zvýšené riziko rozvoje diabetu a kardiovaskulárních poruch, je právě ukládání ektopického tuku, ať už se obezita navenek projeví jako centrální nebo periferní. Jelikož se množství ektopického tuku dá v současné době snadno změřit i neinvazivní metodou, například právě pomocí NMRI nebo CT, mohl by se tento faktor brzy stát důležitým ukazatelem v diagnostice metabolického syndromu.

Na závěr lze říci, že všechny typy obezity, nikoliv pouze obezita centrální, představují rizikové faktory pro rozvoj diabetu a kardiovaskulárních poruch. Jednotlivá tuková depa však k rozvoji těchto poruch přispívají různými mechanismy, jak bude popsáno dále. Ačkoliv nelze říci, že centrální obezita způsobuje rozvoj inzulínové rezistence zatímco periferní obezita nikoliv, stále platí, že centrální lokalizace tukových zásob představuje obecně vyšší riziko než ukládání tuku v podkoží.

1.1.2 Inzulínová rezistence

Jedním z velmi závažných důsledků obezity je inzulínová rezistence. Příčiny jejího vzniku mohou být samozřejmě různé a, jak již bylo zmíněno, ne vždy se tato metabolická porucha pojí s obezitou. Následující kapitola však bude věnována především mechanismům, které se podílejí na rozvoji inzulínové rezistence v závislosti na zvýšené tělesné hmotnosti. Inzulínová rezistence je, podobně jako leptinová rezistence, charakterizována situací, kdy fyziologická koncentrace hormonu vyvolá sníženou biologickou odpověď, která v tomto případě nestačí k udržení euglykémie nejprve v postprandiálním stavu organismu, a s postupující rezistencí i nalačno. Odpovědí na nedostatečnou stimulaci vstupu glukózy do buněk a následnou hyperglykémii je kompenzatorní zvýšení sekrece inzulínu (viz obr.2). Pokud však rozvoj inzulínové rezistence pokračuje v dlouhodobějším měřítku, brzy ani vyšší hladiny inzulínu k udržení euglykémie nestačí. V tuto dobu lze pozorovat zvýšenou hladinu inzulínu (hyperinzulinémií) i zvýšenou hladinu glukózy v krvi (hyperglykémii) zároveň. Dlouhodobá hyperinzulinémie a hyperglykémie se pak podílí na patogenezi mnoha dalších metabolických poruch, které se sdružují pod pojmem „metabolický syndrom“ (např. hypertenze, dyslipidémie a další), a dále na poškození β -buněk pankreatu s následným rozvojem diabetu 2. typu.



Obr. 2.: Hyperbolický vztah míry sekrece inzulínu na citlivosti organismu k inzulínu. T2DM – diabetes mellitus 2. typu

Upraveno podle Stummvoll et al. 2005

1.1.2.1 Vznik inzulinové rezistence

K prvotnímu rozvoji inzulinové rezistence dochází v jednotlivých tkáních různými molekulárními mechanismy, které stále nejsou dokonale prozkoumány. Obezita však způsobuje rozvoj inzulinové rezistence především těmito třemi mechanismy:

1) Nadměrnou koncentrací FFA v krvi, 2) tvorbou lipotoxických metabolitů a 3) chronickou přítomností mírného zánětu hypertrofované tukové tkáně. Ačkoliv jsou tyto tři mechanismy často prezentovány jako tři odlišné hypotézy, pravděpodobně dochází k jejich synergickému působení, což dokládá i to, jak často se vzájemně prolínají a podporují.

1.1.2.1.1 Vliv volných mastných kyselin

U obézních jedinců a pacientů s diabetem 2. typu pozorujeme chronicky zvýšenou hladinu FFA v krvi^{30,31}. Tento jev je pravděpodobně způsoben zvýšeným obrátem FFA v důsledku expanze tukové tkáně^{32,33} a později, po vzniku inzulinové rezistence, i potlačením inzulinem-zprostředkované inhibice lipolýzy v adipocytech³⁴. V dnešní době už je prakticky jisté, že zvýšená hladina FFA v krvi z velké části zodpovídá za rozvoj inzulinové rezistence, což nepřímo dokládá i fakt, že zvýšení hladiny FFA v krvi koreluje s úměrným poklesem citlivosti k inzulinu³⁵, a naopak snížení koncentrace FFA, například pomocí anti-lipolytické látky acipimox, citlivosti k inzulinu zvyšuje³⁶.

FFA působí rozdílně na různé tkáně. Není jasné, ve které z nich se inzulinová rezistence začíná rozvíjet jako první. Jedním z adeptů je kosterní sval³⁷, kde se i za fyziologických podmínek u zdravých jedinců rozvíjí krátkodobá inzulinová rezistence v návaznosti na zvýšení hladiny FFA v krvi³⁸.

Kosterní svalstvo: Již v roce 1963 navrhli Randle a spol. mechanismus, jakým spolu mohou interagovat metabolismy FFA a glukózy. Tyto dva energetické substráty spolu kompetují o kapacitu enzymů mitochondriální oxidace, přičemž zvýšená hladina FFA v krvi se za fyziologických podmínek objevuje především po hladovění, kdy by glukóza měla být ušetřena jako přednostní energetický substrát pro centrální nervovou soustavu. Ve shodě s tímto předpokladem pozoroval Randle *in vitro* vzestup β -oxidace mastných kyselin na úkor katabolismu glukózy v návaznosti na aplikaci lipidů. Předpokládal, že FFA snižují oxidaci glukózy inhibicí některých z glykolytických enzymů³⁹.

Díky využití nukleární magnetické resonance (NMRI) a radioaktivních izotopů uhlíku ^{13}C se inhibiční vliv aplikace tuků na glukózový metabolismus ukázal také v pokusech *in vivo*⁴⁰. Aplikace tuků, ať už intravenózním podáním nebo ve formě tučného pokrmu vyvolala silný vzestup hladiny FFA v krvi. Ten byl přibližně po 2-4 hodinách

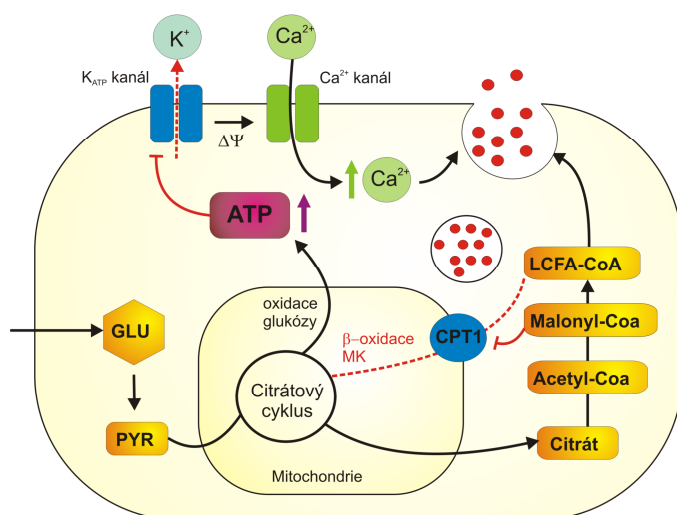
následován silným útlumem v celkovém obratu glukózy (vstup do buněk, oxidace, glykogenogeneze) a téměř absolutním útlumem oxidativního metabolismu glukózy³⁶. Po stanovení koncentrace jednotlivých metabolitů glukózy a aktivity glykolytických enzymů v buňce se ukázalo, že FFA neinhibují metabolismus glukózy na úrovni glykolýzy, ale na úrovni inzulínem stimulovaného vstupu glukózy do buňky⁴¹.

Vysoká hladina FFA tak primárně způsobuje krátkodobou inzulínovou rezistenci na úrovni kosterního svalu, jejímž následkem je posun rovnováhy od utilizace glukózy k utilizaci mastných kyselin. Tento jev se uplatňuje například v těhotenství, kdy vzrůstající hladina FFA v pozdějších fázích gravidity vyvolává periferní inzulínovou rezistenci a oxidace glukózy v těle matky, aby mohla být glukóza přednostně nabídnuta plodu⁴².

Mechanismus, jakým FFA indukují inzulínovou rezistenci, zatím není dokonale prozkoumán. Poslední výsledky naznačují, že se tento děj odehrává na úrovni signalizace inzulínového receptoru. Podle Bodena a spol. je možným mechanismem reesterifikace FFA uvnitř buňky⁴³, která vede nejen ke zvýšené tvorbě TAG a diacylglycerolu (DAG), alosterického aktivátoru proteinkinázy C θ (PKC θ). Tato kináza následně fosforyluje serinové zbytky na inzulínovém receptorovém substrátu IRS-1 a blokuje tak jeho schopnost přenášet inzulínový signál na další molekuly signální kaskády^{41,44}. Tento postup by také vysvětloval, proč se inzulínová rezistence objevuje až několik hodin po zvýšení hladiny FFA v oběhu, ačkoliv se FFA dostávají do buněk poměrně rychle.

Pankreas: Účinky FFA na sekreci inzulínu v pankreatu jsou ambivalentní. Zatímco krátkodobé působení zvýšené hladiny FFA stimuluje výlev inzulínu a při chronicky zvýšené hladině FFA u obézních jedinců způsobuje rozvoj hyperinzulinémie, dlouhodobé působení zvýšené hladiny FFA na pankreas poškozuje signalizační dráhy a vede naopak k hypoinzulinémii a rozvoji diabetu.

Přehledný článek od Corkey a spol. z roku 2000 popisuje mechanismus, podle kterého k exocytóze váčků s inzulínem nestačí samotné zvýšení energetického potenciálu po oxidaci glukózy s následnou inhibicí ATP-regulovaného draslíkového kanálu (K_{ATP} kanál), depolarizací membrány a zvýšením intracelulárního obsahu vápníku. K maximální odpovědi je potřeba ještě podpůrná stimulace estery koenzymu A a volných mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA-CoA, long-chain fatty acid - koenzym A). Ty vznikají v pankreatu ze substrátů, které se hromadí v mitochondriích následkem zvýšené oxidace glukózy v procesu *de novo* syntézy mastných kyselin. Na koenzym A mohou být také esterifikovány FFA, které se do buněk pankreatu dostanou z krevního oběhu. Důležitá je v tomto procesu tvorba malonyl-CoA, který inhibuje karnitin-palmitoylový přenašeč 1 (CPT1), čímž brání vstupu mastných kyselin do mitochondrií a umožňuje tak zvýšení obsahu cytozolických LCFA-CoA⁴⁵ (viz obr. 3).



Obr. 3: Vztah metabolismu glukózy a mastných kyselin k exocytóze váčků s inzulinem v β -buňkách pankreatu.

Zkratky: glukóza (GLU), pyruvát (PYR), mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (LCFA)

Červené šipky – inhibice

Červené přerušované šipky – proces neprobíhá

Toto tvrzení je v souladu s předchozími nálezy, které naznačují, že určitá hladina FFA v krvi je nezbytná k udržení bazální sekrece inzulinu⁴⁶ a že FFA umocňují sekreci inzulinu stimulovanou glukózou^{47,48}. Satureované mastné kyseliny pak vykazují mnohem silnější účinek, než kyseliny nenasatureované a krátké⁴⁹. Jak se zdá, tento efekt je z části zprostředkován s G-proteiny spřaženým receptorem GPR40, který je ve zvýšené míře exprimován v β -buňkách pankreatu hlodavců i lidí a přímo váže FFA⁵⁰.

Tentýž receptor se pravděpodobně podílí i na poškození buněk pankreatu následkem dlouhodobého působení vysokých hladin FFA, které po vazbě na GPR40 stimulují aktivaci transkripčního faktoru PPAR α vedoucí k vyšší míře β -oxidace mastných kyselin v β -buňkách pankreatu⁵¹. Tento proces by pak mohl interferovat s výše uvedenými procesy vedoucími k sekreci inzulinu⁴⁵. Navíc jsou buňky při nadměrné aktivaci PPAR α vystaveny oxidačnímu stresu, který vede ke zvýšené tvorbě kyslíkových radikálů (ROS) a v horším případě až k apoptóze pankreatických buněk.

Játra: V játrech dochází vlivem vysoké koncentrace FFA k nadměrné stimulaci lipogeneze a sekrece VLDL, což zvláště v kombinaci se sníženou citlivostí k inzulinu vede k ukládání ektopického tuku (viz dále). FFA zde také zatím neznámým mechanismem přímo stimulují glukoneogenezi⁵²⁻⁵⁴ a stejně jako v kosterním svalu inhibují inzulinovou signální kaskádu aktivací některých typů proteinkinázy C (PKC ϵ a PKC θ), které následně fosforylují serinové zbytky IRS-1 a tím brání jeho aktivaci inzulinovým receptorem⁵⁵.

1.1.2.1.2 Vliv toxických lipidových metabolitů

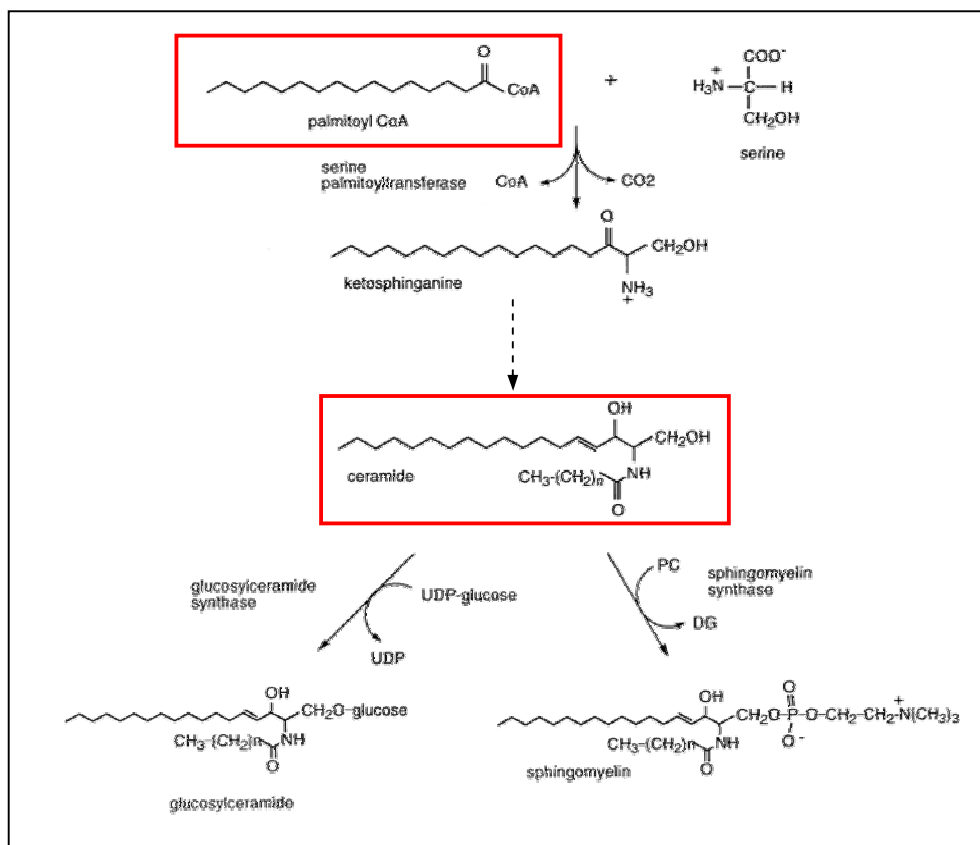
Lipotoxické metabolity vznikají v průběhu metabolismu lipidů a podílí se na poškození inzulinové signalizace. Jedná se především o výše popsany DAG a dále ceramid, meziprodukt procesu *de novo* syntézy sfingolipidů (viz obr.4). Specifickým

substrátem pro syntézu sfingolipidů jsou dlouhé nenasycené mastné kyseliny, především pak kyselina palmitová (C16:0), což by mohlo z části vysvětlovat, proč se potravinové tuky se zvýšeným obsahem nenasycených mastných kyselin jeví jako metabolicky škodlivější^{56,57}.

Pro hypotézu, podle které se zvýšená tvorba ceramidu zásadně podílí na rozvoji inzulinové rezistence, svědčí řada poznatků: 1) obsah ceramidu v plasmě i ve tkáních citlivých k inzulinu je zvýšený u obézních a inzulinorezistentních pacientů a diabetiků^{58,59}; 2) množství ceramidu v organismu koreluje s mírou inzulinové rezistence⁵⁹ a blokování syntézy ceramidu inzulinovou rezistencí snižuje⁶⁰; 3) byly objeveny konkrétní molekulární mechanismy, kterými ceramid přímo inhibuje inzulinovou signalizaci a vyvolává apoptózu buněk ve tkáních citlivých k inzulinu⁵⁷.

Inhibice inzulinové signalizace: Jednou z hlavních inzulinových signalizačních kaskád je dráha zahrnující aktivaci proteinové kinázy Akt/PKB. Vazbou inzulinu na inzulinový receptor se spouští vnitřní tyrozínkinázová aktivita tohoto receptoru. Tato kináza tak nejprve fosforyluje sama sebe, čímž vytvoří vazebná místa pro fosfotyrozín-vazebné domény (PTB) proteinů z rodiny inzulinových receptorových substrátů (IRS). Navázané IRS jsou posléze také fosforylovány tyrozínkinázou inzulinového receptoru, čímž se vytvoří další vazebná místa, tentokrát pro proteiny inzulinové signalizační kaskády, které obsahují takzvanou SH2 (Src-homologní) doménu. Jedním z těchto proteinů je i fosfatidylinositol-3'-kináza (PI3K), která se vazbou na IRS aktivuje a dále fosforyluje fosfatidylinositol (PI), fosfolipid, který je součástí buněčných membrán. Touto fosforylací vzniká fosfatidylinositoldifosfát (PIP₂), který v buňkách obecně slouží k ukotvení některých enzymů na membránu a k jejich aktivaci. Takto se na PIP₂ váže právě kináza Akt/PKB. Vazba Akt/PKB na PIP₂ způsobí změnu konformace této kinázy, umožňující její fosforylaci a aktivaci prostřednictvím několika dalších enzymů⁶¹. Kináza Akt/PKB pak zprostředkovává většinu účinků inzulinu, které se týkají vstupu substrátu do buněk (např. transport glukózy prostřednictvím přenašeče GLUT4, dále inzulinem-stimulovaná vasodilatace, nebo regulace metabolismu lipidů a další)⁵⁷ (shrnutí na obr. 5).

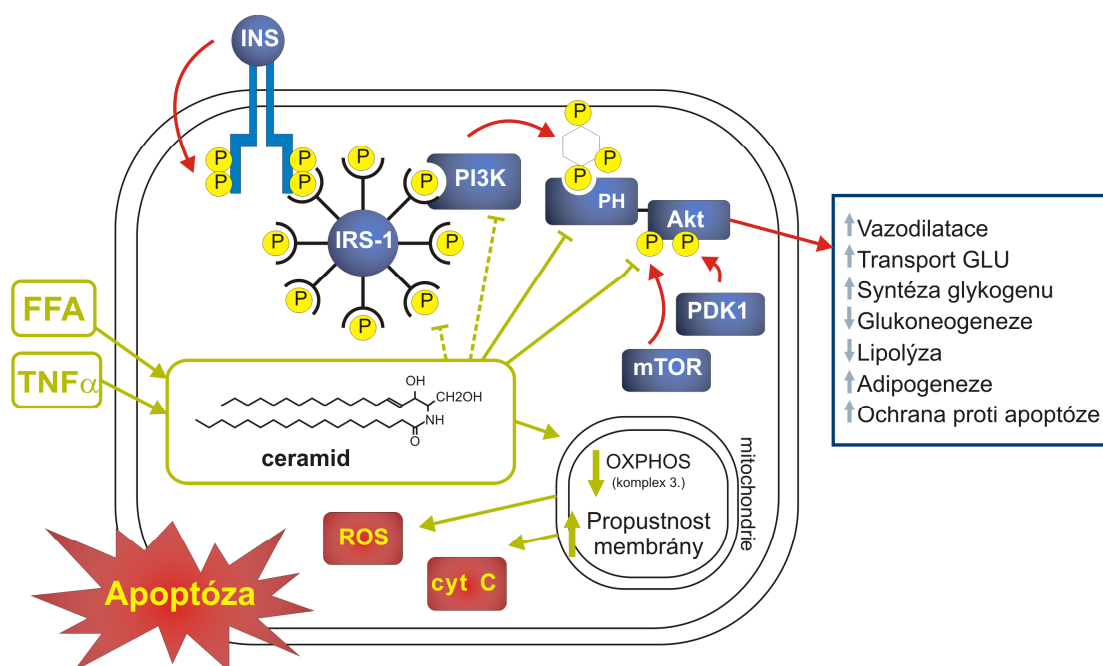
Ceramid inhibuje inzulinovou signální kaskádu především tak, že prostřednictvím proteinfosfatázy 2A (PP2A) stimuluje defosforylaci kinázy Akt/PKB, čímž brání její aktivaci po vazbě na PIP₂, a zároveň blokuje vazbu Akt/PKB na PIP₂ prostřednictvím inhibiční fosforylace proteinkinázou PKCζ⁶². Některé studie naznačují, že by ceramid mohl také inhibovat fosforylaci IRS-1⁶³, nebo inhibovat kinázu PI3K⁶⁴. Tato fakta však na rozdíl od přímé inhibice Akt/PKB nejsou jednoznačně potvrzena. Ceramid je z části zprostředkovatelem účinků cytokinu TNFα a dále volných mastných kyselin, jejichž koncentrace ovlivňuje míru syntézy ceramidu (viz dále).



Obr. 4: Syntéza sfingolipidů *de novo*, upraveno podle Perry 2002

Účinek na mitochondrie: Ceramid funguje jako přímý inhibitor komplexu III dýchacího řetězce v mitochondriích. Důsledkem jeho nadměrného působení je proto narušení funkce oxidativní fosforylace, které se projeví především hromaděním elektronů a vznikem kyslíkových radikálů (ROS) ⁶⁵, což může vést až k apoptóze buněk ⁶⁶. Také se hromadí substráty pro oxidativní metabolismus, např. FFA, což vede k dalšímu zvyšování koncentrace ceramidu, nebo glukóza, což dále přispívá k rozvoji hyperglykémie. V β -buněkách pankreatu má takový zásah zásadní vliv na sekreci inzulinu, která je primárně spouštěna právě zvýšenou aktivitou dýchacího řetězce, respektive nárůstem koncentrace ATP ⁵⁷. U obézních jedinců a diabetiků byla dysfunkce mitochondrií a snížená míra oxidace substrátů popsána ^{67,68}, není však zatím jasné, jestli se jedná o následek, nebo příčinu metabolických poruch spojených s obezitou.

Apoptóza: Kromě stimulace syntézy ROS (viz výše) může ceramid zvyšovat propustnost mitochondriální membrány, což vede k výlevu pro-apoptotických mediátorů, jako je například cytochrom c ⁶⁹. Apoptóza buněk, např. β -buněk pankreatu, myocytů hladkého svalstva ve vlasečnicích, kardiomyocytů nebo hepatocytů, je s úzce spojena s přechodem od inzulinové rezistence k diabetu a ke kardiovaskulárním onemocněním. K apoptóze buněk přispívá ceramid také aktivací indukovatelné syntázy oxidu dusnatého (iNOS – inducible nitric oxide synthase) ⁷⁰.



Obr. 5.: Působení ceramidu na inzulínovou signalizaci a apoptózu

Zkratky: Inzulín (INS), Inzulínový receptorový substrát 1 (IRS-1), fosfatidylinositol-3'-kináza (PI3K), plectstrin-homologní doména (PH), fosfoinositid-dependentní kináza 1 (PDK1), savčí cílový protein pro rapamycin (mTOR), oxidativní fosforylace (OXPHOS), cytochrom C (cyt C), kyslíkové radikály (ROS), volné mastné kyseliny (FFA), tumor necrosis factor α (TNF α)

Červené šipky – inzulínová signalizace, zelené šipky – působení ceramidu, přerušované šipky – nepotvrzený mechanismus

1.1.2.1.3 Vliv chronického zánětu v tukové tkáni

Poměrně nedávno se zjistilo, že nadměrné ukládání tukových zásob vede k rozvoji zánětlivé reakce^{71,72}. V krvi obézních jedinců a pacientů s inzulínovou rezistencí a diabetem 2. typu byly naměřeny vysoké hladiny prozánětlivých cytokinů, jako je např. TNF α (tumor necrosis factor α)^{73,74} nebo interleukin 6 (IL-6)⁷⁴. Na histologických řezech tukovou tkání vysoce obézních, nicméně jinak zdravých laboratorních zvířat, byla pozorována vysoká infiltrace makrofágy. Tyto nálezy souvisely především s výskytem centrální obezity. Ukázalo se, že adipocyty disponují schopností syntetizovat a organizovaně sekretovat širokou škálu cytokinů a že mohou fungovat jako klasické imunitní buňky. Některé z těchto cytokinů pak mohou, stejně jako FFA nebo ceramid, přímo inhibovat inzulínovou signalizaci nebo způsobovat apoptózu buněk⁷². V dnešní době se výskyt zánětu v tukové tkáni považuje za velice významný, ne-li hlavní faktor v rozvoji inzulínové rezistence a jeho potlačení se zdá být důležitým prvkem v léčbě a prevenci této metabolické poruchy. Konkrétní molekulární mechanismy vzniku a rozvoje zánětu tukové tkáně však zdaleka nejsou dokonale prozkoumány.

Centrálními molekulami v zánětlivém procesu jsou kináza JNK (c-Jun NH2 terminal kinase), nukleární faktor- κ -B (NF κ B) a s ním spojená kináza IKK β (inhibitor of NF κ B kinase β). NF κ B je transkripční faktor, který se ve fosforylovaném stavu nachází v cytozolu buňky. Po spuštění zánětlivé reakce je však jeho fosforylace blokována prostřednictvím IKK β , což umožní translokaci NF κ B do jádra a stimulaci transkripce dalších prozánětlivých genů ⁷⁵.

K nastartování zánětu v tukové tkáni, spojeného s nadměrnou stimulací dráhy zahrnující NF κ B a JNK, dochází hned několika mechanismy. Prvním z nich je hypertrofie adipocytů. Jak již bylo uvedeno dříve, míra sekrece adipokinů je úměrná velikosti tukových buněk. Velké adipocyty mají tedy tendenci sekretovat více adipokinů, především těch prozánětlivých ¹⁵. Dalším problémem je ruptura hypertrofických adipocytů, která vede k nekontrolovanému výlevu prozánětlivých cytokinů do mezibuněčného prostoru ^{76,77}. K ruptuře adipocytů dochází v důsledku mechanického namáhání a kritického přečerpání jejich kapacity. K tomuto procesu jsou citlivější adipocyty viscerálního tukového depa, které jsou schopné jen velmi omezené proliferace a mají tedy větší tendenci hypertrofovat. Ve viscerálním tukovém depu se navíc nachází menší množství extracelulárního pojiva a je zde při pohybu vyvíjen vyšší tlak ⁷¹. Výlev cytokinů přitahuje makrofágy, které poškozený adipocyt zcela obklopí. Tento jev můžeme pozorovat na histologických řezech jako takzvanou „korunu“. Makrofágy jsou během své přítomnosti v tukové tkáni hlavním zdrojem dalších prozánětlivých cytokinů, které se podílejí jak na udržování zánětu, tak na rozvoji inzulinové rezistence ^{72,78}.

Druhým mechanismem je aktivace toll-like receptorů (TLR), které jsou na membránách adipocytů hojně přítomny ⁷⁹. TLR jsou fyziologickými spouštěči zánětlivé reakce, které v těle rozeznávají takzvané PAMPs (patogen associated molecular patterns), neboli ligandy, jejichž výskyt značí přítomnost patogenní látky nebo patogenního organismu ⁷¹. Mezi agonisty TLR, přítomných na membránách adipocytů (TLR2 a TLR4), patří také satureované mastné kyseliny, které se u obézních jedinců vyskytují ve zvýšené míře v extracelulárním prostoru ^{80,81}. Aktivace těchto receptorů vede k výlevu již zmíněných prozánětlivých cytokinů, infiltraci makrofágů a nastartování zánětlivého procesu v tukových buňkách ⁷¹. Zajímavé je, že nesatureované mastné kyseliny, především n-3 polynenasycené mastné kyseliny, mají naopak tendenci působit spíše protizánětlivě a inhibovat signalizaci TLR-4 ⁸².

Počátky zánětu v tukové tkáni souvisí také s hypoxií a oxidativním stresem, spojeným s nadměrnou produkcí kyslíkových radikálů (ROS). Oba tyto faktory aktivují zánětlivé procesy stimulací signalizační dráhy vedoucí přes NF κ B a JNK ⁸³.

Zánět tukové tkáně se od akutního zánětu výrazně liší. Vzhledem k tomu, že obezita je chronický stav, je i tento zánět chronický. Probíhá velice mírně a bez destruktivních následků na okolní tkáň. Chybí také některé typické projevy akutního zánětu, jako je například zvýšená teplota, nebo tvorba hnisu. V anglickém textu jsou pro

něj vyčleněny zvláštní pojmy, jako například „low-grade inflammation“, „parainflammation“, nebo „metaflammation“ (metabolický zánět) ^{71,72}.

Role TNF α v rozvoji inzulínové rezistence: Na rozvoji inzulínové rezistence se různou mírou přímo či nepřímo podílí značné množství zánětlivých cytokinů, z nichž nejznámější jsou IL-6 ⁸⁴ a především pak TNF α . TNF α realizuje většinu svých aktivit vazbou na receptor TNF-R1, čímž spouští signální kaskádu zahrnující aktivaci NF κ B a JNK ⁷⁵. Podílí se na stresové a prozánětlivé odpovědi buněk mimo jiné také modulací energetického metabolismu. V průběhu akutního zánětu zvyšuje v krvi obsah lipoproteinových částic, především VLDL, což umožňuje neutralizovat toxické účinky některých látek, například bakteriálního lipopolysacharidu (LPS) ⁸⁵. Dále zvyšuje obsah TAG a glukózy v krvi, aby poskytl energetický substrát imunitním buňkám v krevním oběhu. Z krátkodobého hlediska akutního zánětu jsou tyto účinky pro organismus výhodné, při jejich dlouhodobém přetrvávání v důsledku chronického zánětu se však některé z nich vysokou měrou podílí na rozvoji inzulínové rezistence ⁸⁶.

Vysokou hladinu VLDL v krvi udržuje TNF α tak, že inhibuje endoteliální lipoproteinovou lipázu (LPL), která se jinak podílí na degradaci těchto částic ^{87,88}. V adipocytech TNF α stimuluje aktivitu hormonsenzitivní lipázy (HSL) a tím zvyšuje míru lipolýzy a sekrece FFA do krevního oběhu ^{89,90}. V ostatních buňkách pak podporuje syntézu FFA *de novo* nepřímou stimulací acetyl-koenzym A-karboxylázy (ACC), klíčového enzymu v tomto procesu ⁹¹. Vysoká hladina FFA v krvi se projeví zvýšenou jaterní produkcí TAG, která v chronickém stavu přejde do trvalé hypertriglyceridémie ⁹². Zvýšená hladina FFA dále narušuje inzulínovou signalizaci, zatímco zvýšená produkce TAG v játrech přispívá k ukládání ektopického tuku. TNF α také ovlivňuje metabolismus cholesterolu, což se při chronickém zánětu projeví vysokým nárůstem obsahu aterogenních LDL (low-density lipoprotein) částic a poklesem HDL (high-density lipoprotein) částic v krvi ⁸⁶.

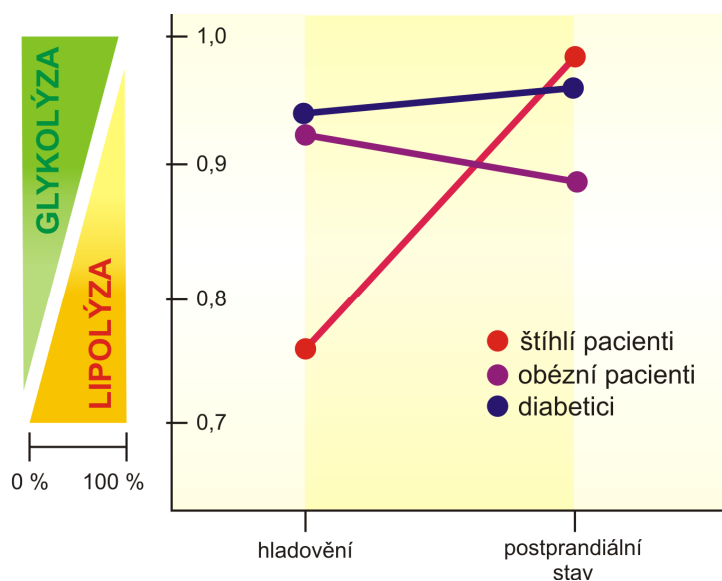
K rozvoji hyperglykémie přispívá TNF α přímou inhibicí inzulínové signalizace. Prostřednictvím různých atypických proteinkináz C vyvolává fosforylaci serinových zbytků IRS-1, a tím inhibuje tyrozínkinázovou aktivitu inzulínového receptoru ⁹³. Tento účinek je velmi podobný účinku FFA a má za následek především sníženou expresi přenašečů GLUT4 na buněčných membránách, spojenou se sníženým transportem glukózy do buněk kosterního svalstva a adipocytů ⁸⁶.

1.1.2.2 Projevy inzulinové rezistence v jednotlivých tkáních

Kosterní svalstvo: V kosterním svalstvu inzulin stimuluje především translokaci glukózových přenašečů GLUT4 na membránu myocytů za účelem vstupu glukózy do buňky a jejího využití v procesu oxidace nebo glykogenogeneze. Zatímco játra spotřebují maximálně třetinu absorbované glukózy, svalové buňky takto z krve odstraní až 80% glukózy přijaté v potravě⁹⁴. Inzulinová rezistence ve svalu proto vede ke sníženému vstupu glukózy do buněk, což se projeví hyperglykemií v postprandiálním stavu³⁴.

V souvislosti s výše popsaným Randlovým cyklem³⁹ je také nutné zmínit stav, který je všeobecně znám pod pojmem „metabolická inflexibilita“. Zdravý jedinec je schopen přizpůsobit svůj metabolismus aktuálně nabízenému substrátu, neboli je metabolicky flexibilní. Jak Randle popsal, v období hladu, kdy jsou hlavním zdrojem energie mastné kyseliny, probíhá v buňkách převážně β -oxidace mastných kyselin mimo jiné proto, že lipidové metabolity inhibují vstup glukózy do buňky. Po příjmu potravy však dochází k sekreci inzulinu, který mastné kyseliny usměrní zpět do tukových dep, zprostředkuje expresi glukózových přenašečů na membránách myocytů a umožní přednostní zpracování glukózy v procesu glykolýzy.

Tyto změny lze pozorovat metodou nepřímé kalorimetrie při měření respiračního koeficientu (RQ), který udává poměr výdeje CO_2 a příjmu O_2 . Tyto hodnoty napoví, jaký typ substrátu je v danou chvíli převážně metabolizován. Při převládající glykolýze v postprandiálním období se RQ blíží hodnotě 1. Čím více pak probíhá β -oxidace a spalování tuků, tím více se RQ blíží hodnotě 0,7. Jak ukazuje obrázek 6., u zdravých jedinců se RQ dynamicky mění, zatímco u obézních nebo inzulinorezistentních jedinců je jeho hodnota prakticky stále stejná⁹⁵. Neschopnost přizpůsobit metabolismus nabídce substrátů je z části důsledkem, z části příčinou postprandiální hyperglykémie a trvalé dyslipidémie^{95,96}.



Obr. 6.: RQ pacientů s různou mírou metabolické inflexibility.

Osa y: RQ

Upraveno podle Kelley et al. 2000

Adipocyty: V adipocytech je hlavní úlohou inzulínu stimulovat po příjmu potravy ukládání tukových zásob. Inzulín proto inhibuje činnost hormonsenzitivní lipázy (HSL) tak, že zprostředkuje její fosforylaci⁹⁷ s následným utlumením lipolýzy a sekrece FFA do krevního oběhu. Naopak *de novo* syntéza mastných kyselin a lipogeneze je inzulínem stimulována⁹⁸, což přispívá k vysoké míře reesterifikace FFA na TAG. Adipocyty rezistentní vůči inzulínu vykazují především zvýšenou aktivitu HSL, což se projeví vysokou sekrecí FFA a následně zvýšenou hladinou FFA v krvi⁹⁹. Viscerální tuková tkáň je navíc k inzulínu obecně mnohem méně citlivá, než tkáň subkutánní, což může přispívat k větší rizikovosti centrální obezity^{27,28}. Zvýšená hladina FFA v krvi se pak vysokou mírou podílí na ukládání ektopického tuku například do myocytů, pankreatu nebo do jater.

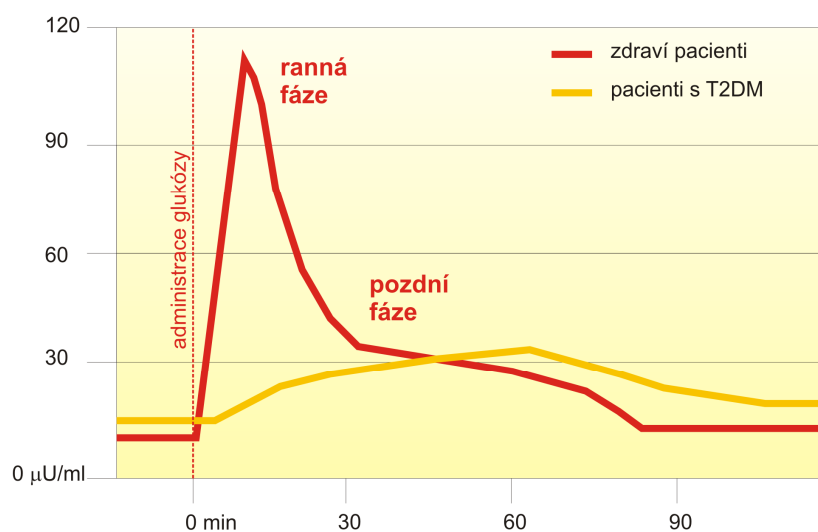
Játra: Dá se říci, že játra jsou pro inzulín hlavním cílovým orgánem. Pankreas sekretuje inzulín přímo do portálního oběhu, což znamená, že veškerý inzulín, který působí na periferní tkáň, musí játry projít, přičemž značná část je ho v této tkáni zachycena a využita k regulaci jaterního metabolismu. Játra se také hlavní mírou (přibližně 80 %¹⁰⁰) podílejí na odstranění inzulínu prostřednictvím jeho vazby na receptor s následnou internalizací a endozomální degradací^{100,101}. Inzulín v játrech brání rozvoji postprandiální hyperglykémie tak, že stimuluje glykolýzu a glykogenezi a naopak inhibuje glukoneogenezi a glykogenolýzu. Působí i na metabolismus lipidů tak, že stimuluje lipogenezi a tvorbu lipoproteinů. Většina těchto mechanismů probíhá prostřednictvím regulace exprese příslušných genů.

Jak se ukázalo, nejzávažnějším důsledkem inzulínové rezistence v játrech je nadměrná míra glukoneogeneze, která způsobuje zvýšenou hladinu glykémie nalačno a významně se podílí i na udržování hyperglykémie v postprandiálním stavu. Tento stav je, mimo jiné, jedním z hlavních diagnostických markerů inzulínové rezistence⁶. U diabetiků

je míra jaterní glukoneogeneze vyšší než u zdravých jedinců přibližně o 25 % ¹⁰². Některé studie ukázaly, že jaterní glukoneogeneze může být zpětnovazebně inhibována i zvýšenou hladinou glukózy ¹⁰³. Jak ale ukázaly pokusy na myších se specifickou dysfunkcí inzulinových receptorů v játrech (LIRKO mouse), samotná zvýšená hladina glukózy bez příspěvku inzulinu k inhibici glukoneogeneze nestačí ¹⁰⁴. Dalším neméně závažným důsledkem inzulinové rezistence v játrech je snížení míry degradace inzulinu, které se významně podílí na rozvoji hyperinzulinémie ^{104,105}.

Pankreas: Na povrchu β -buněk pankreatu najdeme, stejně jako na membránách myocytů, hepatocytů, adipocytů a dalších buněk citlivých k inzulinu, inzulinové receptory, což naznačuje, že i v pankreatu je autokrinní signalizace inzulinu důležitá ¹⁰⁶. Konkrétní mechanismy, kterými inzulin reguluje vlastní sekreci, ještě nejsou zcela známy. Pokusy na myších se specifickou delecí těchto receptorů v β -buněk pankreatu (β IRKO mouse) ukázaly, jaký vliv by na funkci β -buněk mohla mít jejich inzulinová rezistence ¹⁰⁷.

Inzulin je v β -buněk pankreatu sekretován ve dvou fázích ¹⁰⁸ (viz obr.7). V první fázi dochází k velmi rychlé a intenzivní sekreci inzulinu, která často předchází fyzickému přechodu nutrientů ze střeva do krve. Prvotní součástí této ranné fáze je také takzvaná „cefalická fáze“, která je iniciována centrální nervovou soustavou v návaznosti na chuťový podnět při konzumaci potravy ¹⁰⁹. Dále je ranná fáze stimulována oxidací glukózy. Na udržování pozdní fáze sekrece se pak podílí například samotný inzulin, nebo dlouhé mastné kyseliny (viz výše). U myši β IRKO první fáze sekrece inzulinu zcela chyběla ¹⁰⁷ stejně, jako je tomu obecně u pacientů s diabetem 2. typu ^{110,111}. Přitom některé studie naznačují, že právě intenzita 1. fáze sekrece inzulinu má největší vliv na hodnotu glykémie v postprandiálním stavu. Inzulinová rezistence v β -buněk pankreatu by se proto mohla podílet na postupném snižování sekrece inzulinu a zároveň na rozvoji postprandiální hyperglykémie ¹¹⁰.



Obr. 7: Dynamika inzulinové sekrece. Osa X: Čas [min], osa Y: hladina inzulinu v krvi [μU/mL]

Upraveno podle
www.biodel.com

1.1.3 Metabolický syndrom

Metabolický syndrom představuje souhrn několika klinických symptomů, jejichž společný výskyt znamená velmi vysoké riziko rozvoje kardiovaskulárního onemocnění a diabetu 2. typu. Jedná se především o snížení inzulínové senzitivity spojené s glukózovou intolerancí a hyperglykemií nalačno, dyslipidémií (vysoký obsah TAG, FFA a LDL cholesterolu a naopak nízký obsah HDL cholesterolu v krvi), hypertenzi a obezitu ⁶. Účelem definice metabolického syndromu je možnost prostřednictvím rutinních laboratorních testů a měření včas odhalit pacienty s vysokým rizikem rozvoje diabetu 2. typu kardiovaskulárních onemocnění.

Jako první postuloval myšlenku propojení těchto symptomů a kardiovaskulárního onemocnění Raeven v roce 1988. Jako rizikové faktory označil inzulínovou rezistenci, hyperglykémii a hypertenzi ¹¹². Tento soubor rozšířil o rok později Kaplan na abdominální obezitu, hyperlipidémii, hypertenzi a glukózovou intoleranci a označil jej za „smrtící kvartet“ ¹¹³. V současné době je vztah metabolických poruch, hormonální rezistence a rozvoje kardiovaskulárního onemocnění velmi dobře známý a prozkoumaný i na molekulární úrovni. Diagnostická kritéria metabolického syndromu se v různých zemích mírně odlišují. Popis diagnózy tří známých zdravotnických organizací ukazuje tabulka č.1.

Ačkoliv se ještě donedávna usuzovalo o inzulínové rezistenci jako o hlavní příčině, rozvoj metabolického syndromu mohou ovlivnit různé faktory. Může se jednat například o genetickou predispozici, různé metabolické nebo hormonální poruchy, nebo o vedlejší účinek léčby glukokortikoidy ¹¹⁴. Objevují se také názory, že predispozice k pozdějšímu rozvoji metabolického syndromu může být získána v ranných fázích ontogeneze programováním metabolismu plodu na základě vnějších vlivů a příjmu specifických nutrientů od matky ¹¹⁵. Nejčastější příčinou je však stále obezita způsobená nadměrným příjmem potravy a s ní spojená inzulínová rezistence.

Tab. 1: Diagnostická kritéria Metabolického syndromu některých zdravotnických organizací.
(Podle Gade et al. 2010)

| Symptom/Organizace | WHO | NCPE (také diagnóza v ČR*) | AACE |
|-----------------------|---|--|---|
| Hyperglykémie | IFG, nebo DM2 | FG > 110 mg/dL | FG > 110 – 125 mg/dL OGTT, T2, glykémie > 140 mg/dL |
| Inzulínová rezistence | DM2 | IFG, IR, ne DM2 | IFG, IR, ne DM2 |
| Centrální obezita | BMI > 30 nebo zvýšený poměr obvodu pasu a boků | Zvýšený obvod pasu | BMI > 30 nebo zvýšený obvod pasu |
| Hypertriglyceridémie | TG > 150 mg/dL | TG > 150 mg/dL | TG > 150 mg/dL |
| Hypercholerolémie | HDL < 35 mg/dL (muži) HDL < 39 mg/dL (ženy) | HDL < 40 mg/dL (muži) HDL < 50 mg/dL (ženy) | HDL < 40 mg/dL (muži) HDL < 50 mg/dL (ženy) |
| Hypertenze | > 140/90 mm Hg | > 130/85 mm Hg | > 130/85 mm Hg |
| Jiné faktory | Renální dysfunkce | Žádné | Sedavý životní styl, věk, etnická příslušnost, rodinné predispozice |
| Diagnóza | Diabetes, IFG nebo IR + 2 a více z výše uvedených | 3 a více z výše uvedených | Výše uvedené |

Zkratky: WHO (world health organization), NCPE (National cholesterol educational programe), AACE (American asociation of clinical endocrinologists), IFG (impaired fasting glycemia, zvýšená hodnota glykémie nalačno), DM2 (diabetes mellitus 2. typu), FG (fasting glucose, glykémie nalačno), OGTT (orální glukózový toleranční test) – hodnota v T2 (po dvou hodinách od aplikace glukózy), IR (inzulínová rezistence)

*podle Karen, Souček et al. 2007¹¹⁶

1.1.4 Onemocnění spojená s ukládáním tuku v játrech

Inzulínová rezistence je spojena se zvýšenou mírou ukládání ektopického tuku v mnoha orgánech, nicméně nejcitelněji se tento fenomén projevuje v játrech. Jak už bylo zmíněno v kapitole o lokalizaci tuku v těle, míra inzulínové rezistence a množství ektopického tuku spolu velmi dobře korelují ^{7,29}. Není však stále jasné, co je příčinou a co následkem. Některé práce dokládají, že TAG, uložené v jaterní tkáni, působí lipotoxicky na jaterní buňky a jsou příčinou rozvoje této metabolické poruchy ¹¹⁷.

Současný názor se však přiklání spíše k možnosti, že ukládání ektopického tuku může být pouze vedlejším efektem inzulínové rezistence a že k němu může docházet i nezávisle na tomto jevu, aniž by došlo k následnému poklesu citlivosti k inzulínu ¹¹⁸.

Metabolismus tuků v játrech probíhá ve zkratce následujícím způsobem: Játra po příjmu potravy vstřebávají jak tuky ve formě FFA, tak glukózu. Část glukózy je uložena ve formě glykogenu. Jakmile jsou játra glykogenem nasycena, což se děje přibližně v době, kdy množství glykogenu přesáhne 5 % hmotnosti jater, začne být glukóza přetvářena na mastné kyseliny v procesu lipogeneze. Mastné kyseliny jsou v době hladovění oxidovány v procesu β -oxidace mastných kyselin. V době sytosti jsou však esterifikovány na glycerol za tvorby TAG, které jsou pak ve formě částic VLDL sekretovány z jater do krevního oběhu a distribuovány do ostatních tkání, především pak do tukových dep. K hromadění TAG v játrech tedy může dojít několika mechanismy: 1) zvýšeným příjmem FFA z krevního oběhu; 2) zvýšenou mírou *de novo* syntézy FFA; 3) sníženou mírou β -oxidace mastných kyselin a 4) snížením formace a sekrece VLDL částic. Jak se zdá, k ukládání tuku do jater přispívá jednak zvýšená koncentrace FFA v krvi, která doprovází obezitu a inzulínovou rezistenci, a dále zvýšená míra *de novo* syntézy FFA ¹¹⁹. Důležitou roli hraje samozřejmě také snížená míra oxidace tuků, která se vyskytuje ve spojitosti s leptinovou rezistencí ^{11,12} a s mitochondriální dysfunkcí ¹²⁰.

Ukládání tuků v játrech způsobuje progresivní onemocnění, u kterého rozlišujeme několik stupňů. Prvním stupněm je jaterní steatóza, pro kterou se využívá také anglické zkratky NAFLD (non-alkoholic fatty liver disease). Jaterní steatóza není sama o sobě nebezpečná, nemusí nutně znamenat poškození jater a naopak, její rozvoj pravděpodobně chrání játra před inzulínovou rezistencí ¹¹⁹. Ta je totiž indukována lipotoxickými účinky FFA a jejich metabolitů, jako jsou acyl-CoA a ceramid. Ukládání FFA ve formě neutrálních molekul TAG tyto lipotoxické účinky neutralizuje a oddaluje tak rozvoj jaterního poškození ^{121,122}.

Dalším stupněm je steatohepatitis (NASH, non-alkoholic steatohepatitis), neboli steatóza spojená se zánětem jaterní tkáně. Zatímco NAFLD je benigní onemocnění, které představuje spíše indikátor metabolických poruch nebo zvýšeného rizika rozvoje inzulínové rezistence a diabetu, NASH je poměrně závažný stav, který může vést k poškození jaterních buněk a snížení jejich sekreční a detoxikační funkce. Poškozená jaterní tkáň je posléze nahrazována kolagenními vlákny a dochází k rozvoji cirrhózy, která se může zvrhnout v jaterní karcinom ¹¹⁹.

1.1.5 Diabetes mellitus 2. typu

Diabetes 2. typu (T2DM) je onemocnění, při kterém dysfunkční β -buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu nedokáží syntetizovat dostatečné množství inzulínu, aby mohly kontrolovat koncentraci glukózy v krvi. Rozvíjí se stav hyperglykémie jednak po jídle, kdy inzulín není schopen dostatečně stimulovat vstup glukózy do svalových buněk, a jednak nalačno, kdy chybí inzulínem zprostředkovaná inhibice jaterní glukoneogeneze. Doprovodnými znaky diabetu jsou dyslipidémie, trvale zvýšený krevní tlak, atherogeneze, poškození ledvin a další. Především dyslipidémie a hyperglykémie spojená s diabetem pak přispívá k rozvoji kardiovaskulárních onemocnění, která představují pro diabetiky největší riziko ¹²³.

Rozlišujeme dva typy diabetu. Příčinou rozvoje diabetu 1. typu je autoimunitní degradace pankreatických buněk T-lymfocyty, která vede přímo k postupnému snižování až k úplnému zastavení sekrece inzulínu ¹²⁴. U pacientů s tímto typem diabetu nelze naměřit vůbec žádnou, nebo jen velmi nízkou hladinu inzulínu, a k udržení euglykémie jim stačí relativně nízké dávky tohoto hormonu, protože senzitivita na úrovni inzulínové signalizace je nepoškozená ¹²³.

Pro diabetes 2. typu se v angličtině užívá také název „non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM“, protože hladina inzulínu v krvi pacientů s tímto onemocněním je ve srovnání se zdravými jedinci přibližně stejná, někdy i vyšší ¹²⁵. Příčinou rozvoje tohoto onemocnění je totiž poškození inzulínové signalizace, neboli inzulínová rezistence. Jak již bylo popsáno výše, organismus na sníženou inzulínovou aktivitu odpoví kompenzačním navýšením sekrece inzulínu, které ale s postupným zhoršováním inzulínové senzitivity přestává k udržení euglykémie stačit. V době, kdy lze naměřit hyperinzulinémii a hyperglykémii zároveň, hovoříme o takzvaném prediabetickém období. Diabetes se pak rozvíjí, když následkem dlouhodobé hyperinzulinémie a dalších průvodních jevů inzulínové rezistence, jako je trvale zvýšená hladina FFA v krvi, dyslipidémie a přítomnost chronického zánětu, dojde k poškození β -buněk pankreatu a snížení sekrece inzulínu. Jelikož inzulínová rezistence v průběhu diabetu přetrvává, potřebují pacienti s T2DM mnohem vyšší dávky inzulínu, než pacienti s diabetem 1. typu ¹²³. Podle WHO je diabetes 2. typu diagnostikován, když hladina glykémie přesáhne 126 mg/dL ve stavu nalačno, nebo 140 mg/dL po dvou hodinách glukózového tolerančního testu (viz 3.2.1 Intraperitoneální glukózový toleranční test) (www.who.int 2006).

Příčiny poškození β -buněk pankreatu a inzulínové sekrece, které vedou k rozvoji T2DM, jsou velice komplexní a jejich podrobný rozbor je mimo rozsah této práce. Některé z obecných principů byly popsány v předchozích kapitolách. Jedná se o různé cesty vedoucí k apoptóze buněk, například zánět, zvýšená syntéza ceramidu, nebo akumulace ROS v důsledku mitochondriální dysfunkce. Příčinou snížení sekrece inzulínu je také

lipotoxicita (viz 1.1.3.1.1 Vliv volných mastných kyselin) a glukotoxicita, tedy nadměrná míra oxidace glukózy, která opět vede k akumulaci ROS¹²³.

Tato práce je zaměřena na metabolické poruchy spojené s obezitou. Je však nutné dodat, že příčin rozvoje inzulínové resistance i T2DM je mnohem více, jak bylo popsáno v předchozím textu. Pozitivním faktem je, že s pomocí řady diagnostických metod lze identifikovat zvýšené riziko rozvoje T2DM spojeného s obezitou dlouho před výskytem kritických diagnostických symptomů, jako je hyperglykémie nalačno, a lze mu proto relativně úspěšně předcházet, případně oddálit jeho nástup i v prediabetické fázi. O možných strategiích v léčbě diabetu 2. typu velmi stručně pojednává následující kapitola.

1.1.6 Strategie v léčbě diabetu

Prvním krokem v prevenci a léčbě diabetu je vždy úprava životního stylu spojená s větším množstvím pohybu a úbytkem hmotnosti při konzumaci diabetické diety. Současným trendem je spojovat již tyto ranné fáze léčby s užíváním metforminu, který bez výraznějších vedlejších účinků pomáhá snižovat tělesnou hmotnost a zvyšuje citlivost organismu k inzulínu, aniž by přitom zatěžoval pankreas další potřebou sekrece inzulínu. Po přechodu z prediabetické do diabetické fáze již většinou metformin k udržování euglykémie nestačí a je třeba zavést další léčbu¹²³.

Thiazolidindiony: Tyto léky působí jako agonisté nukleárního receptoru PPAR γ . Ten stimuluje, jak bylo popsáno výše, proliferaci a dozrávání adipocytů. Účinkem podávání thiazolidindionů je tedy rozšíření kapacity subkutánní tukové tkáně, které je sice spojeno s nárůstem tělesné hmotnosti, nicméně dopomůže k reorganizaci tukových zásob z viscerálních tukových dep do podkoží, ke snížení hladiny FFA v krvi a ke snížení míry ukládání ektopického tuku. Dalším pozitivním účinkem je snižování hladiny některých prozánětlivých cytokinů v krvi. K vedlejšími účinkům těchto léků patří nežádoucí nárůst tělesné hmotnosti a zadržování vody v těle, které může vést k otokům a velmi vzácně také k srdečnímu selhání.

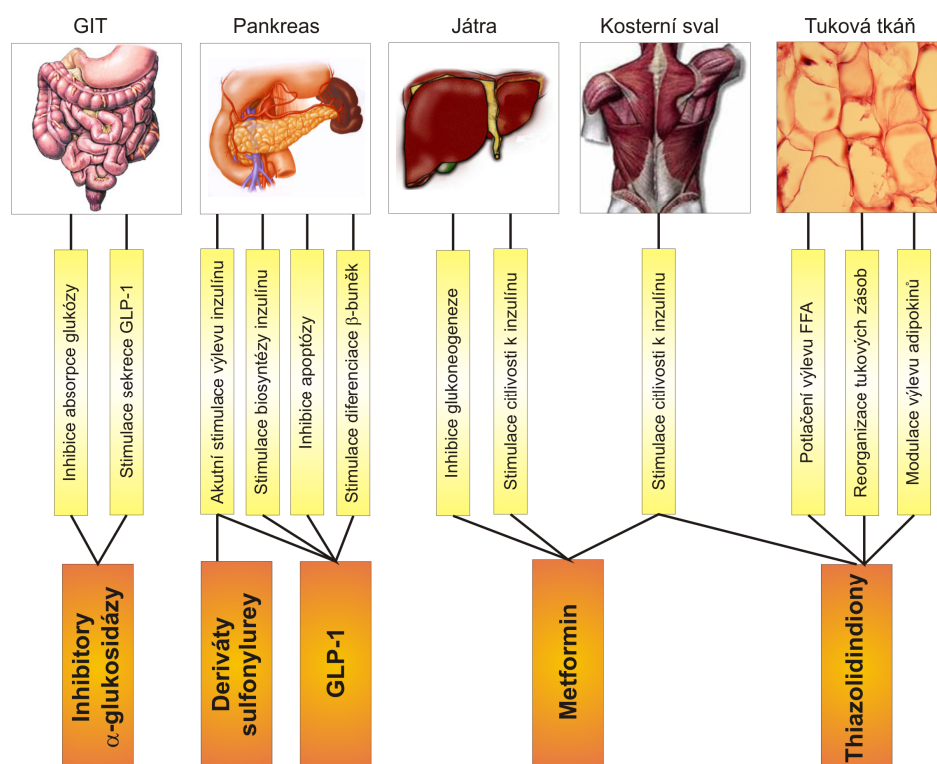
Deriváty sulfonylurey: Látky z této skupiny se specificky váží na sulfonylureový receptor SUR1 na β -buňkách pankreatu. Tento receptor se pak podílí na uzavření draslíkového kanálů K_{ATP} a na spuštění kaskády vedoucí k sekreci inzulínu. Cílem těchto léků je tedy zvýšit sekreci inzulínu. Protože se tento jev odehrává nezávisle na koncentraci glukózy v krvi, hrozí při jejich užívání příležitostný rozvoj hypoglykémie.

Inhibitory α -glukosidázy: Tyto látky působí jako kompetitivní inhibitory enzymu α -glukosidáza, který se nachází na kartáčovém lemu tenkého střeva, kde pomáhá štěpit složité cukry, jako je například škrob, na jednoduché. Inhibicí tohoto enzymu se tedy snižuje míra vstřebávání cukrů ve střevech, čímž se nepřímo snižuje také glykémie v postprandiálním stavu.

Inkretiny: Nejznámějším inkretinem je GLP-1 (glucagon-like peptide 1). Inkretiny jsou obecně intestinální hormony sekretované buňkami tenkého střeva v návaznosti na příjem potravy, které přímo stimulují sekreci inzulínu a jsou proto pro léčbu diabetu potenciálně velice atraktivní. V organismu jsou však tyto látky okamžitě inaktivovány enzymem dipeptidylpeptidáza 4 (DPP4). Pro praktické využití bude proto nutné vyvinout látky odolné vůči tomuto enzymu, nebo podávat inkretiny v kombinaci s inhibitory DPP4.

Exogenní inzulín: Inzulín je zásadním prvkem substituční léčby při poškození buněk pankreatu. Jeho nevýhodou je, že pouze kompenzuje nedostatečnou funkci pankreatu, aniž by přispíval k léčbě, nebo alespoň ke zpomalení průběhu onemocnění. Jeho podávání je proto vhodné kombinovat s léky, které zvyšují citlivost k inzulínu, jako je například metformin.

Biguanidy: Tyto látky zvyšují citlivost k inzulínu především v játrech a v menší míře také v periferních tkáních. O jediném biguanidu na trhu, metforminu, pojednává celá následující kapitola.



Obr. 8.: Strategie v léčbě diabetu

Upraveno podle Stumvoll et al. 2005

1.2 Metformin

Metformin, přesněji 1,1-dimetylbiguanid je v současné době jedním z nejpoužívanějších léků proti T2DM^{126,127}. Patří do skupiny léčiv na bázi biguanidu, jejichž použití sahá až do středověku, kdy se k léčbě onemocnění, které můžeme podle popsaných příznaků zařadit k metabolickému syndromu nebo T2DM, používala rostlina s názvem *galega officinalis*, neboli Jestřabina lékařská. Ta obsahuje vysoké množství biguanidů, mezi nimi také metformin. Čistý metformin se pak používá k léčbě i prevenci T2DM zhruba od roku 1950¹²⁸. Jedná se o lék první volby, který předepisují lékaři jak pacientům s T2DM, tak těm, kteří patří do rizikové skupiny (vysoký body mass index – BMI, centrální obezita, snížená inzulínová senzitivita, nezdravý životní styl).



Obr. 9: Jestřabina lékařská
galega officinalis

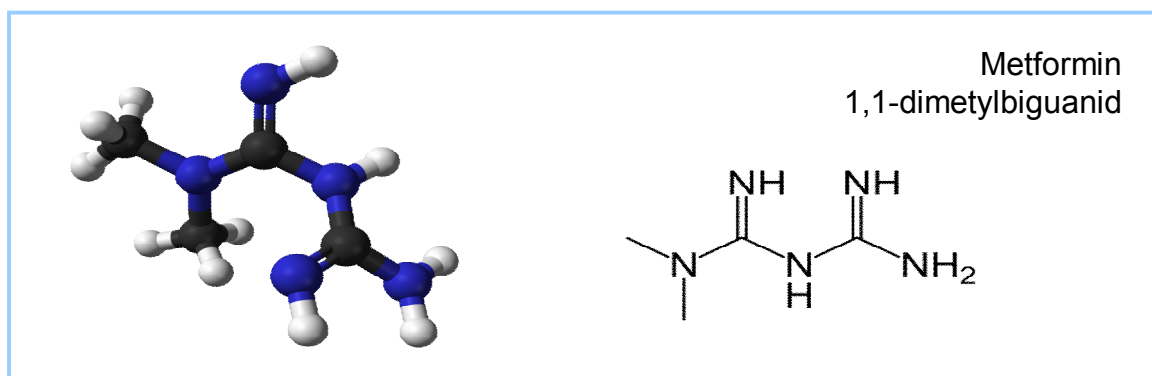
Převzato z www.hlasek.com

Hlavní benefiční účinek metforminu spočívá ve snižování hladiny glukózy v krvi bez dalšího navýšování sekrece inzulínu. Tím potlačuje vznik hyperinzulinémie a rozvoj inzulínové rezistence. Metformin dále příznivě ovlivňuje metabolismus lipidů, konkrétně stimuluje oxidaci mastných kyselin a naopak potlačuje lipogenezi a sekreci VLDL v játrech, čímž se zpomaluje ukládání tuků v játrech a rozvoj NAFLD. Díky nižšímu obsahu volných mastných kyselin v krvi se také zpomaluje rozvoj inzulínové rezistence. Metformin dále potlačuje rozvoj kardiovaskulárního onemocnění, které je s cukrovkou spojeno, a tím výrazně snižuje morbiditu i mortalitu^{126,127}. Méně probádaný je pak protektivní účinek na β -buňky pankreatu, který byl doposud prokázán pouze v pokusech *in vitro* na buněčných kulturách¹²⁹. V poslední době se uvažuje také o využití při léčbě syndromu polycystických ovarií¹³⁰ a některých druhů rakoviny¹³¹.

Použití metforminu má i nežádoucí vedlejší účinky. Ty jsou ale ve srovnání s jinými antidiabetiky (thiazolidindiony, inzulín) poměrně mírné¹²⁷. Jedná se především o nechutenství, nevolnost, průjem nebo zvracení. Tyto nežádoucí účinky se dají zmírnit nebo zcela potlačit postupným navýšováním dávky a přijímáním léku při jídle. Asi 5%

pacientů pak kvůli těmto nežádoucím účinkům nemůže lék přijímat vůbec ¹²⁷. Mnohem závažnější komplikaci představuje laktátová acidóza, jejíž mortalita dosahuje 30 – 50%. Její incidence je naštěstí pouze 1:30 000 případům za rok a dá se jí předcházet vyloučením použití metforminu při výskytu závažných kontraindikačních stavů ¹²⁶, jako je selhávání jater, závažné postižení ledvin a tendence k výskytu hypoxických stavů, například kvůli kardiomyopatii, nebo kardiovaskulárním poruchám ¹³².

Metformin působí v mnoha tkáních, hlavními cílovými buňkami jsou však hepatocyty, myocyty, kardiomyocyty a adipocyty. Právě v játrech bývá jeho koncentrace mnohem vyšší než v ostatních tkáních díky převažujícímu výskytu organického kationtového přenašeče 1 (OCT1), který je hlavním zprostředkovatelem vstupu metforminu do buňky. Tento přenašeč zprostředkovává také intestinální absorpci metforminu ¹³³. V ledvinách se pak nachází další kationtový přenašeč OCT2, který zprostředkovává vylučování metforminu z organismu ¹³⁴.



Obr. 10: Metformin: Vzorec a trojrozměrná struktura, převzato z www.wikipedia.org

1.2.1 Molekulární mechanismus působení metforminu

Ačkoliv je metformin uznávaným lékem již déle než půl století, molekulární mechanismy jeho působení nebyly doposud objasněny. Velmi pravděpodobné je, že v signalizačních drahách metforminu hraje klíčovou roli AMP-aktivovaná kináza ¹³⁵, která však není metforminem aktivována přímo ^{135,136}. Prokázány jsou také mechanismy, které aktivaci AMPK nezahrnují vůbec ¹³⁷.

Způsob, jakým metformin aktivuje AMPK zůstává také nejasný. Velmi lákavé se zdá být vysvětlení, které podali Owen a spol. v roce 2000. Podle tohoto tvrzení je metformin přímým inhibitorem komplexu I dýchacího řetězce v mitochondriích. Tento mechanismus zůstává doposud jednou z pravděpodobných možností, ačkoliv je stále předmětem diskuzí a nejrůznějších důkazů pro i proti ^{136,138}.

1.2.1.1 Jakým způsobem metformin aktivuje AMPK?

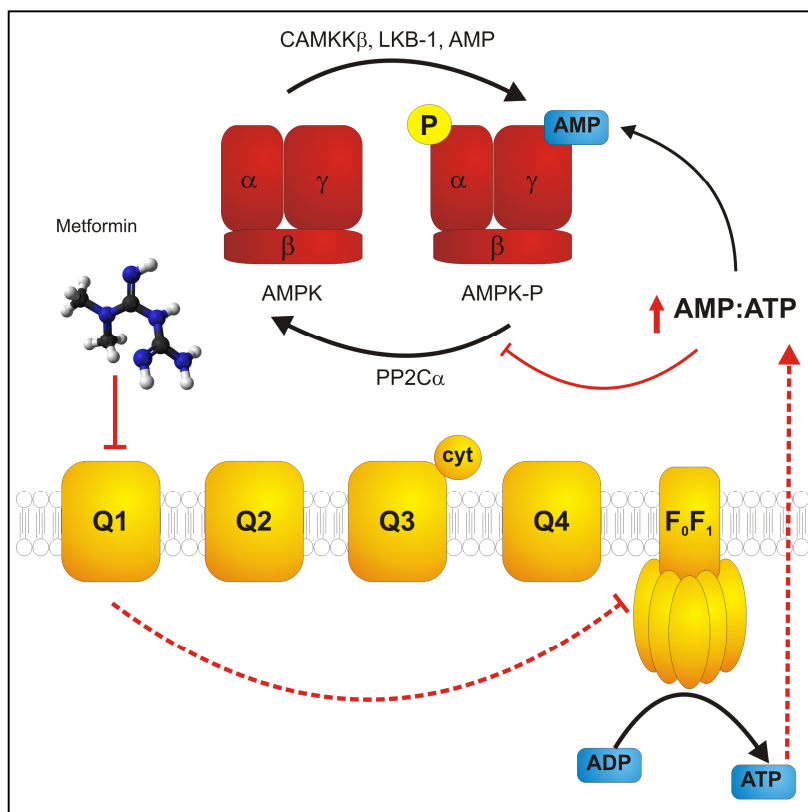
Podle Owena a spol. metformin inhibuje komplex I dýchacího řetězce mitochondrií, čímž snižuje poměr ATP:ADP. Adenylát kináza odštěpuje fosforečnan z ADP za vzniku AMP a to se pak podílí na aktivaci AMPK. Metformin působí jako poměrně slabý inhibitor komplexu I, takže změny v poměru ATP:AMP nemusí být často příliš patrné ¹³⁶, nicméně díky silné potenciaci účinku AMPK mohou způsobit velké metabolické změny (viz obr. 11).

Důsledkem inhibice dýchacího řetězce v mitochondriích může být kromě aktivace AMPK také již dříve zmíněná laktátová acidóza. Pokles poměru ATP:AMP stimuluje ve všech orgánech glykolýzu, což se projeví zvýšením hladiny laktátu v krvi. Metformin navíc blokuje vstup laktátu do glukoneogenní kaskády (viz dále), což vede k jeho další akumulaci. Tento jev je za normálních podmínek kompenzován schopností mnohých orgánů (například jater, srdečního svalu atp.) laktát oxidovat. Ve stavu hypoxie však může dojít k nekontrolovatelnému hromadění laktátu a následné otravě ¹³⁹. Incidence laktátové acidózy je naštěstí při užívání metforminu velmi nízká. K mnohem vyšší incidenci docházelo dříve při užívání dnes již zakázaného léku phenforminu, biguanidového ekvivalentu metforminu ¹³². Owen ve svém článku navrhuje mechanismus, který tuto odlišnost jinak dvou velmi podobných molekul vysvětluje.

V transportu metforminu do mitochondrie a při zpětnovazebné regulaci jeho působení by mohl mít význam kladný membránový potenciál, který vzniká při transportu protonů přes membránu v rámci oxidační fosforylace. Metformin nese kladný náboj, nicméně stále je dostatečně malou lipofilní molekulou, která může velmi pomalu prostupovat přes membránu. Jeho průnik do mitochondrie je stimulován právě kladným membránovým potenciálem. Metformin se v mitochondrii kumuluje a inhibuje dýchací řetězec, což se následně projeví sníženým transportem protonů přes membránu a poklesem membránového potenciálu. To pak zabrání dalšímu vstupu metforminu, dokud se membránový potenciál neobnoví. Phenformin má mnohem více lipofilní charakter a nenese žádný náboj, díky čemuž prostupuje do mitochondrií mnohem rychleji a nezávisle na membránovém potenciálu. Navíc je přenášen přenašečem OCT1 s větší afinitou než metformin ¹³³. Tyto faktory, především pak absence zpětnovazebné regulace, se projevují mnohem rychlejším a intenzivnějším účinkem na dýchací řetězec a bohužel i častější incidencí laktátové acidózy ¹⁴⁰.

Nejnovější poznatky v této oblasti přináší článek publikovaný v roce 2011, podle kterého metformin neaktivuje AMPK kinázu inhibicí komplexu I dýchacího řetězce, ale inhibicí AMP-deamidázy (AMPD), enzymu, který se podílí na degradaci AMP v rámci purinového cyklu. Tato hypotéza byla mimo jiné podpořena faktem, že myši s delecí genu pro AMPD na léčbu metforminem neodpovídaly. Inhibice AMPD prostřednictvím jiného známého inhibitoru, erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)-adeninu (EHNA), navíc vyvolala

totožné metabolické změny na buněčných kulturách, jako aplikace metforminu. Byl také podán přímý důkaz, že metformin AMPK skutečně inhibuje, zatímco u inhibice dýchacího řetězce můžeme stále mluvit jen o důkazech nepřímých¹³⁸. Jak se zdá, na definitivní potvrzení mechanismu, jakým metformin aktivuje AMPK, si budeme muset ještě nějaký čas počkat.



Obr 11: Nepřímá aktivace AMPK prostřednictvím metforminu.

Metformin inhibuje komplex I dýchacího řetězce, čímž nepřímo zvyšuje poměr AMP:ATP vně mitochondrie. AMP pak působí jako alosterický koaktivátor AMPK a zároveň inhibuje fosfatázu PP2C α , která AMPK defosforyluje.

1.2.1.2 AMPK v signální dráze metforminu

Jak již bylo řečeno, zapojení AMPK v léčebných účincích metforminu je jedním z mála potvrzených faktů. AMPK je považována za intracelulární energetický senzor a je obecně aktivována ve stavu energetického nedostatku, což se vždy projeví jako pokles poměru ATP:ADP. Nepřímo ji tedy aktivuje svalová kontrakce, fyzická aktivita, nedostatek potravy nebo různé formy fyziologického stresu, jako je například hypoxie, hypoglykémie nebo osmotický šok¹⁴¹. K aktivaci AMPK jsou primárně zapotřebí některé z nadřazených kináz, například LKB1 nebo CAMKK β , které fosforylují Thr172 uvnitř aktivační smyčky katalytické α podjednotky¹⁴². Alosterická vazba AMP na regulační podjednotku γ pak stimuluje fosforylaci těmito kinázami a naopak inhibuje defosforylaci AMPK proteinfosfatázou 2C α (PP2C α), čímž aktivitu AMPK mnohonásobně zvyšuje¹⁴³. Naopak vysoké koncentrace ATP aktivaci AMPK inhibují kompeticí o vazebné místo pro AMP¹⁴².

Dalšími přirozenými aktivátory AMPK jsou hormony adiponektin a leptin, farmakologicky lze AMPK aktivovat pomocí AICARu (5-aminoimidazol-4-karboxamid-1- β -D-ribofuranosid) nebo právě metforminem. AICAR je látka, která je po vstupu do buňky fosforylována na AICAR-monofosfát (ZMP) a působí jako analog AMP¹⁴⁴. Účinek AICARu na metabolismus je velmi podobný účinku metforminu, a právě tento fakt vedl k hypotéze o inhibici dýchacího řetězce.

AMPK se výrazně podílí na udržování energetické homeostázy organismu modulací buněčného metabolismu glukózy a lipidů směrem k navýšení produkce a snížení spotřeby ATP. Najdeme ji také v mozku, především v hypothalamu a v NST (nucleus tractus solitarii) mozkového kmene, kde působí jako jeden z orexigenních hormonů¹⁴¹. Metformin tedy v organismu uměle navodí podmínky energetického nedostatku, čímž aktivuje AMPK a tím následně umožní efektivní metabolismus cukrů a lipidů, které se jinak při diabetu hromadí a způsobují další zhoršování metabolického stavu nemocného.

1.2.1.3 Mechanismy nezávislé na AMPK

Aktivace AMPK při léčbě metforminem se stala téměř dogmatem, proto bylo poměrně překvapivé, když se v roce 2010 objevil článek Foretze a spol., který poměrně přesvědčivě dokázal, že inhibice jaterní glukoneogeneze metforminem je na AMPK zcela nezávislá. Klíčové glukoneogenní enzymy byly podle tohoto článku inhibovány přímo AMP, respektive klesajícím energetickým potenciálem hepatocytů (viz dále). Tento fakt vedl k zamyšlení nad tím, jestli je aktivace AMPK skutečně tak klíčová, zvláště proto, že se o AMPK uvažovalo a stále uvažuje jako o zajímavém cíli pro léčbu nejrůznějších metabolických poruch a rakoviny¹⁴⁵.

Na základě tohoto objevu je tedy nutné uvažovat o změně energetického potenciálu a aktivaci AMPK minimálně jako o dvou různých signalizačních drahách, které se mohou někdy překrývat a vzájemně doplňovat. S největší pravděpodobností existuje více molekulárních mechanismů účinku metforminu na metabolismus, mezi nimi i těch, které jsou na aktivaci AMPK nezávislé.

1.2.2 Účinky metforminu na energetický metabolismus

1.2.2.1 Vliv na glykémii

Metformin je obecně látka, která působí hypoglykemicky a to bez další potřeby sekrece inzulinu. Díky tomu dochází ke zlepšení senzitivity k inzulinu na periférii i v játrech postiženého organismu. Ke snižování hladiny glukózy v krvi dochází dvěma mechanismy. Především se snižuje míra jaterní glukoneogeneze, která je u diabetiků

signifikantně zvýšená a výrazně se podílí na dysbalanci glykémie nalačno i po jídle. Druhým mechanismem je pak zvýšení absorpce glukózy ve svalech.

Snižování jaterní glukoneogeneze: Pokusy *in vitro* na modelu perfundovaných jater ukázaly, že aplikace metforminu na játra diabetických potkanů vede k inhibici vstupu laktátu do hepatocytů, přeměnu pyruvátu na alanin, jakožto jednu z výchozích látek pro glukoneogenezi, a snižuje aktivitu klíčových glukoneogenních enzymů pyruvát-karboxylázy (PC) a fosfoenolpyruvátkarboxykinázy (PEPCK) ^{146,147}.

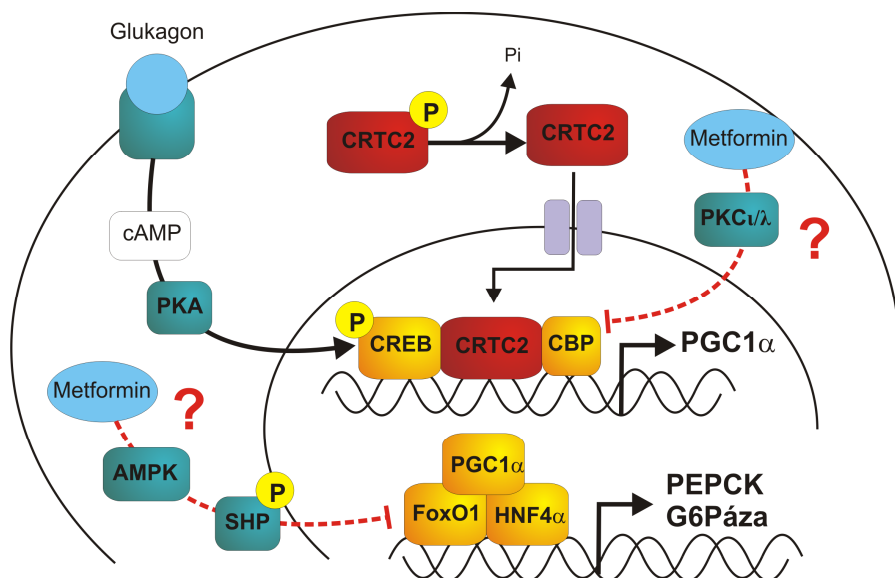
Co se molekulárního mechanismu týče, ještě donedávna se usuzovalo, že k inhibici glukoneogeneze dochází nepřímou aktivací osy LKB1/AMPK a že cílovou molekulou, která je prostřednictvím AMPK fosforylována, je protein CRTC2 (CREB-regulated transcription coactivator 2). Tento protein je ve svém fosforylovaném stavu lokalizován v cytoplasmě, zatímco po defosforylaci může být translokován do jádra, kde v komplexu s několika dalšími transkripčními faktory stimuluje expresi klíčových genů pro glukoneogenezi ¹⁴⁸. Podobně stimuluje glukoneogenezi také hormon glukagon (viz obr.12).

Tento názor byl posléze vyvrácen faktem, že u jedinců s inzulínovou rezistencí dochází ke specifické glykosylaci transkripčního faktoru CRTC2, která popsanou fosforylaci kinázou AMPK činí velmi nepravděpodobnou ¹⁴⁹. Toutéž kaskádou se později zabýval Lim He a spol., který dokázal, že proteinem, fosforylovaným prostřednictvím metforminu, by mohl být CBP (CREB binding protein), který tvoří spolu s CREB a CRCT2 komplex ovlivňující transkripci glukoneogenních genů. Tento způsob zahrnuje aktivaci atypické protein kinázy PKC ι/λ ¹⁵⁰.

Další možností je, že AMPK, aktivovaná po aplikaci metforminu, fosforyluje protein SHP (small heterodimer partner). Ten po fosforylaci vstupuje do jádra, kde inhibuje aktivitu několika transkripčních faktorů, které se mimo jiné podílejí i na transkripci genů pro glukoneogenezi ¹⁵¹.

Pokusy s geneticky modifikovanými myšmi kmeny deficientními pro AMPK nebo LKB1 však později ukázaly, že regulace glukoneogeneze metforminem je na AMPK nezávislá a pravděpodobně se ani neodehrává na úrovni transkripce glukoneogenních genů ¹³⁷. Jako pravděpodobný mechanismus nastínili autoři mechanismus regulace glukoneogeneze prostřednictvím snižování jaterního energetického potenciálu, což se mimo jiné projeví jako výrazný vzestup hladiny AMP. To pak působí jako účinný alosterický inhibitor enzymu fruktózo-1,6-bisfosfatázy, který je jedním z klíčových glukoneogenních enzymů.

Faktem nicméně zůstává, že aktivace AMPK vede k inhibici glukoneogeneze a že metformin je mimo jiné i aktivátorem AMPK. Jako pravděpodobná se tedy jeví možnost, že se různé mechanismy působení metforminu, ať už na AMPK závislé či nikoliv, uplatňují v buňce zároveň, a synergisticky tak inhibují jaterní tvorbu glukózy *de novo*.

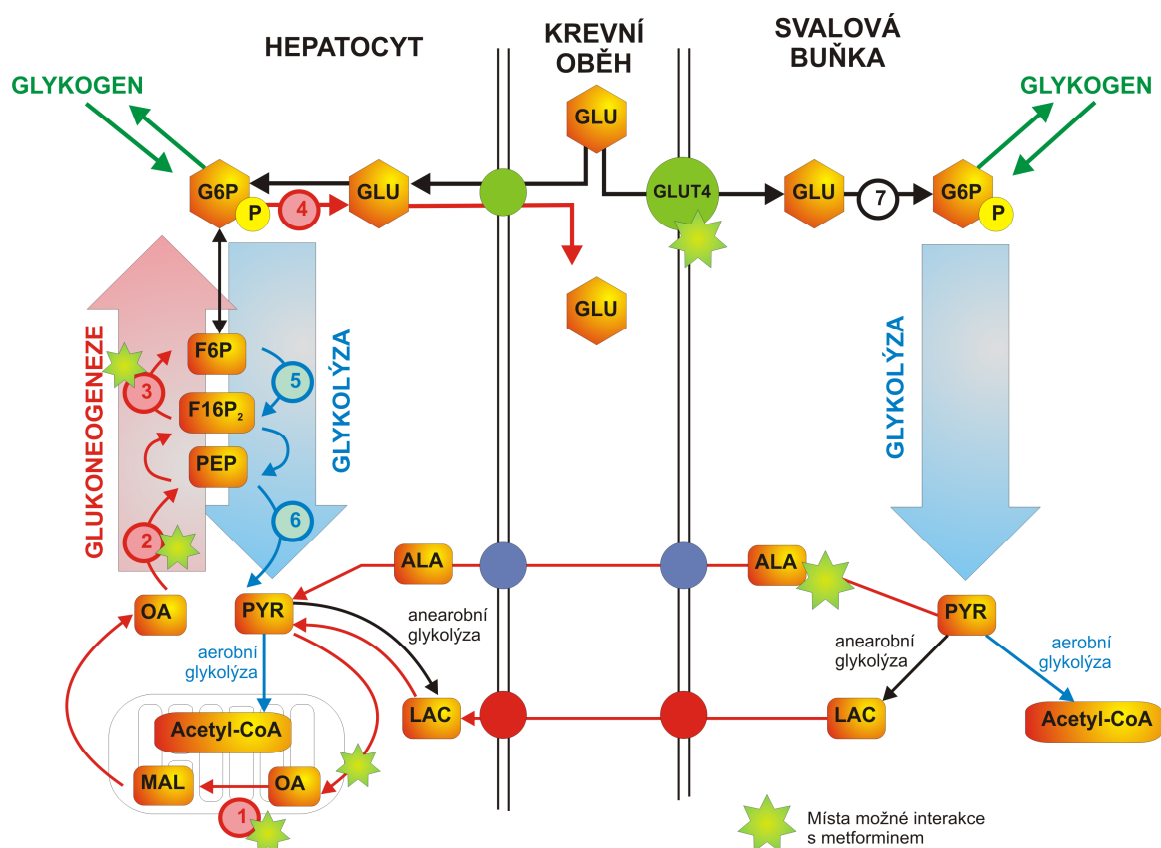


Obr. 12: Regulace exprese genů pro glukoneogenezi.

Transkripce těchto genů je zprostředkována komplexem transkripčních faktorů FoxO1, HNF4α a PGC1α. Poslední z transkripčních faktorů je pak transkribován pomocí dalšího komplexu, CREB-P, CRTC2 a CBP. Hormon glukagon stimuluje glukoneogenezi tak, že fosforyluje transkripční faktor CREB pomocí proteinkinázy A (PKA). Tu aktivuje prostřednictvím syntézy cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Metformin by se na regulaci glukoneogeneze mohl podílet fosforylací transkripčního faktoru CBP (CREB binding protein) prostřednictvím atypické proteinkinázy PKCι/λ, čímž by bránil vstupu CBP do transkripčního komplexu. Dalším možným mechanismem je fosforylace proteinu SHP (small heterodimer partner) prostřednictvím AMPK, což by znamenalo inhibici aktivity transkripčních faktorů FoxO1 a HNF4α. Podobným mechanismem inhibuje glukoneogenezi také hormon inzulin.

Zvyšování absorpce glukózy ve svalích: O tom, jestli se pozitivní účinky metforminu na snižování glykémie odehrávají i na úrovni kosterního svalstva, stále nevládne obecná shoda¹⁵². Podle mnoha podaných důkazů se však zdá, že při podání metforminu se skutečně zvyšuje vstup glukózy do svalů. Molekulární mechanismus tohoto účinku zatím stále není znám. Klíčovou roli zde, podobně jako v jaterních buňkách, pravděpodobně hraje svalová AMPK, jejíž aktivita se po podání metforminu zvyšuje¹⁵³.

Několik studií na buněčných kulturách ukázalo vliv metforminu na signalizační kaskádu inzulinu vedoucí k translokaci glukózových transportérů GLUT4 na membránu svalových buněk. Konkrétně se jednalo například o stimulaci tyrozínkinázové aktivity inzulinového receptoru^{154,155}. Poslední výsledky Lee a spol. z roku 2010 navrhuji konkrétní mechanismus, a to zvýšení exprese proteinu Rab4 prostřednictvím aktivace AMPK, což vede ke zvýšení exocytózy váčků s přenašeči GLUT4¹⁵⁶.



Obr.13: Koloběh glukózy v organismu a místa, kde by metformin mohl působit na snižování glykémie
 Zkratky: glukóza (GLU), glukóza-6-fosfát (G6P), fruktóza-6-fosfát (F6P), fruktóza-1,6-bisfosfát (F16P₂), fosfoenolpyruvát (PEP), pyruvát (PYR), oxalacetát (OA), malát (MAL), laktát (LAC), alanin (ALA)
 Čísla (klíčové enzymy v utilizaci glukózy): 1 – pyruvátkarboxyláza (PC), 2 – fosfoenolpyruvátkarboxykináza (PEPCK), 3 – fruktóza-1,6-bisfosfatáza, 4 – glukóza-6-fosfatáza (G6Páza) 5 – fosfofruktokináza, 6 – pyruvátkináza, 7 – hexokináza
 Červené šipky značí reakce, které jsou součástí procesu glukoneogeneze

1.2.2.2 Vliv na lipidový metabolismus

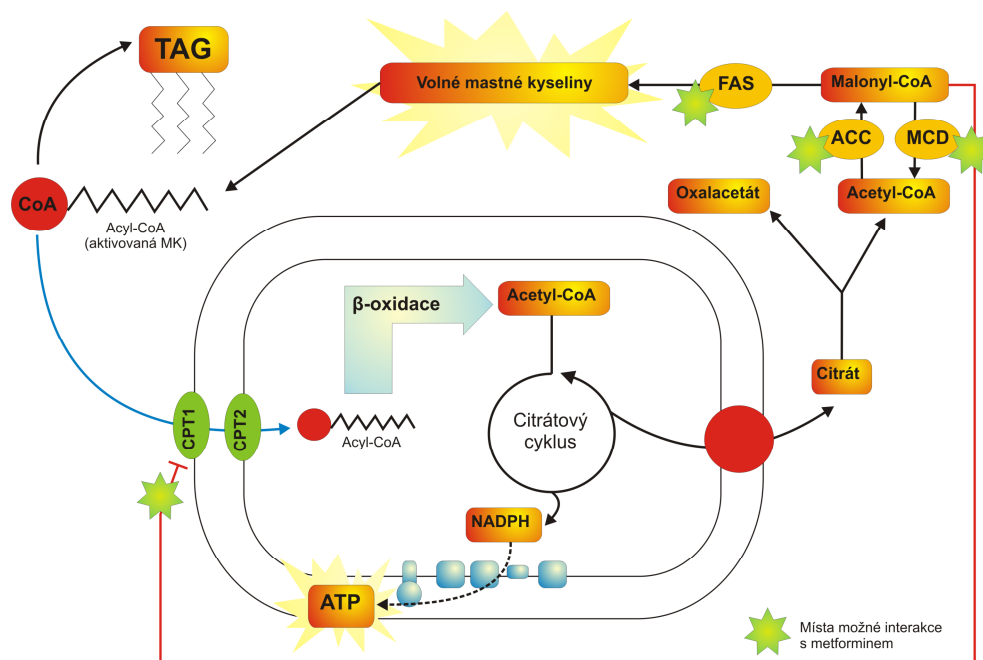
U pacientů i laboratorních zvířat léčených metforminem můžeme pozorovat také značné zlepšení metabolismu lipidů. Právě nerovnováha v metabolismu lipidů, která vede k nadměrné koncentraci volných mastných kyselin v krvi, je v poslední době považována za jednu z hlavních příčin rozvoje T2DM.

Metformin potlačuje lipolýzu v adipocytech a lipogenezi v játrech, čímž obsah volných mastných kyselin a triacylglycerolu v krvi snižuje¹²⁷. V neposlední řadě metformin snižuje také syntézu cholesterolu a následně i sekreci LDL částic¹⁵⁷. Účinek metforminu je shodný s účinkem aktivované AMPK (například pomocí AICARu), proto se prozatím předpokládá, že metformin působí na metabolismus lipidů právě prostřednictvím tohoto enzymu. Účinek metforminu na lipidový metabolismus nezávislý na AMPK zatím nebyl popsán.

Inhibice lipogeneze v játrech: Metformin prostřednictvím AMPK inhibuje lipogenezi poměrně komplexním způsobem. Základním mechanismem je přímá inhibice enzymu acetyl-CoA-karboxylázy (ACC), který se uplatňuje při přeměně acetyl-CoA na malonyl-CoA, výchozí substrát pro syntézu mastných kyselin (viz obr.14). AMPK fosforylaci ACC inhibuje jeho aktivitu ^{158,159}. AMPK také snižuje expresi syntázy mastných kyselin (FAS) ¹⁶⁰ a stimuluje aktivitu malonyl-CoA-dekarboxylázy, která naopak převádí malonyl-CoA na Acetyl-CoA ^{158,161}.

Stejně jako lipogenezi inhibuje metformin také syntézu cholesterolu. Klíčovým enzymem v tomto procesu je 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA-reduktáza (HMG-CoA-reduktáza), která je stejně jako ACC fosforylována a inhibována prostřednictvím AMPK ¹⁵⁷.

Stimulace β -oxidace mastných kyselin: Malonyl-CoA, výchozí substrát pro FAS, působí zároveň jako účinný alosterický inhibitor karnitinpalmitoyltransferázy 1 (CPT1). Tento přenašeč zabezpečuje transport mastných kyselin do mitochondrie za účelem oxidace a tvorby energie. Jako bylo popsáno výše, AMPK hned dvěma mechanismy snižuje koncentraci malonyl-CoA, čímž usměrňuje tok FFA do mitochondrií a zvyšuje tak míru β -oxidace ¹⁶².



Obr. 14: Proces lipogeneze a β -oxidace mastných kyselin v buňce

Zkratky: TAG-triacylglycerol, CoA – koenzym A, FAS – syntáza mastných kyselin, ACC – acetyl-CoA-karboxyláza, MCD – malonyl-CoA-dekarboxyláza, CPT – karnitinpalmitoyltransferáza

2 Cíle diplomové práce

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci výzkumného zaměření laboratoře Biologie tukové tkáně, kterým je studium benefičních účinků n-3-polynenasycených mastných kyselin (n-3 PUFA) v prevenci a léčbě inzulinové resistance a T2DM spojeného s obezitou. Účinek n-3 PUFA na rozvoj nebo reverzi obezity u laboratorních myší se studuje v rámci dlouhodobých pokusů. Obezita je vyvolána podáváním vysokotukové diety, jejíž hlavní obezitogenní složkou jsou n-6 PUFA (především kyselina linolová, 18:2 n-6), obsažené v kukuřičném oleji. V současné době se v laboratorní praxi objevují také další diety s obezitogenním účinkem, které by mohly být pro tento výzkum vhodnější. První dva cíle této diplomové práce jsou tedy následující:

1. Porovnání obezitogenního potenciálu vysokotukové diety s vysokým obsahem n-6 PUFA (dieta HFD) a vysokotukové diety s vysokým obsahem nasycených mastných kyselin a sacharózy (dieta HSD).

2. Srovnání účinků diety HFD a HSD na metabolismus cukrů a lipidů.

Metformin, jak bylo popsáno v literárním úvodu, je u pacientů s inzulinovou rezistencí a T2DM lékem první volby. V laboratorní praxi však není běžné podávat metformin laboratorním zvířatům v rámci dlouhodobých pokusů. Z toho vyplývají další dva cíle této práce:

3. Zavedení metody chronické léčby metforminem.

4. Porovnání účinků metforminu na metabolismus cukrů a lipidů u myší krmených dietami HFD a HSD.

3 Metody

3.1 Práce s laboratorními zvířaty

Pokusy byly prováděny na samcích laboratorních myši kmene C5BL/6, které jsou náchylné k rozvoji obezity indukované dietou. Zvířata byla chována v klecích po třech až čtyřech. V místnosti byl udržován umělý 12-hodinový světelný režim a teplota 22°C.

Do prvního pokusu byly myši nasazeny ve stáří 4 měsíce. Do začátku pokusu přijímaly myši standardní dietu (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo), poté jim byly po dobu osmi týdnů podávány experimentální obezitogenní diety (Ssniff, HF diet, HS diet, složení viz dále, Ssniff, Německo). Do druhého pokusu byly myši nasazeny ve stáří 7,5 měsíce. První tři měsíce života byly krmeny standardní dietou (Ssniff EF R/M control diet, Ssniff, Německo), poté přijímaly 4,5 měsíce vysokotukovou dietu cHF, která svým složením odpovídá dietě HFD (složení popsáno dále), stimulující rozvoj obezity a inzulinové rezistence. Samotný pokus pak trval 10 týdnů.

Myši byly v průběhu pokusů krmeny specifickou obezitogenní dietou (viz 3.1.1 Experimentální diety) *ad libitum*, 3x týdně dostávaly novou dávku diety a měření spotřeby diety probíhalo 2x týdně. Metformin (Glucophage, Merck, Německo) byl myším podáván rozpuštěný v pitné vodě v dávce 50 mg na kilogram tělesné váhy za den (mg/kg BW za den), 200 mg/kg BW za den a 400 mg/kg BW za den. Kontrolní skupiny dostávaly pouze pitnou vodu bez metforminu. Optimální koncentrace metforminu ve vodě se řídila průměrnou spotřebou vody a průměrnou hmotností myši v dané skupině. Pitná voda s metforminem byla připravována a měněna 2x týdně. Při výměně byla stanovována také spotřeba vody. Myši byly každý týden váženy.

Na konci obou pokusů proběhla pitva s odběrem vzorků tkání a plasmy. Myši byly usmrčeny cervikální dislokací v éterové narkóze. Krev byla odebrána z krční tepny do 1,5ml mikrozkrumavky s 5 µl 0,5M EDTA. Poté byla centrifugována 10 min. při 5320 g a teplotě 4°C. Plasma byla uchovávána při teplotě -20°C. Při pitvě byly odebrány vzorky jater, gonadálního a mesenterického tuku, hnědé tukové tkáně a kosterních svalů, které byly následně zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány při teplotě -80°C.

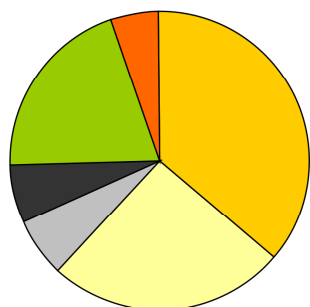
3.1.1 Experimentální diety

V obou pokusech byly použity vysokotukové diety HFD a HSD vyrobené dle našich požadavků firmou Sniff. V obou dietách je téměř 60% energie obsaženo v tucích. Dieta HFD obsahuje kukuřičný olej, tvořený z větší části n-6 PUFA, sacharidovou složku tvoří škrob (100% glukóza). Dieta je dodávána v pastovité formě. Dieta s označením HSD pak ve srovnání s HFD představuje dietu s potenciálně silnějším účinkem na rozvoj metabolických poruch. Tučky jsou zde zastoupeny ve formě vepřového sádla, které obsahuje především nasycené mastné kyseliny. Významnou složku tvoří také jednoduchý cukr sacharóza (50% glukóza, 50% fruktóza). Dieta je dodávána ve formě tvrdých pelet.

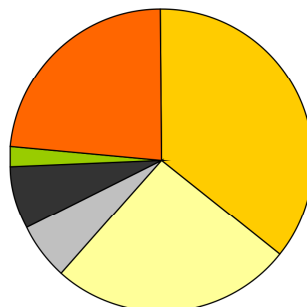
Tab. 2: Energetický obsah jednotlivých makronutrientů v experimentálních dietách

| | HFD | HSD |
|-----------------------------|-------------|------------|
| Proteiny | 24,1 % | 24,1 % |
| Tuk | 34 % | 34 % |
| Vláknina | 6 % | 6 % |
| Minerální složka | 6,1 % | 6,1 % |
| Škrob | 19 % | 2,2 % |
| Sacharóza | 5 % | 22,4 % |
| Celková energetická hodnota | 21,4 MJ/ kg | 21,4 MJ/kg |

HFD - vysokotuková dieta s kukuřičným olejem a škrobem



HSD - vysokotuková dieta s vyšším obsahem cukru a vepřovým sádlem



| | mol % | | g lipidů / 100 g diety | |
|------------|-------|-------|------------------------|------|
| | HFD | HSD | HFD | HSD |
| 10:0 | 0,01 | 0,04 | 0,00 | 0,01 |
| 12:0 | 0,04 | 0,12 | 0,01 | 0,02 |
| 14:0 | 0,06 | 1,63 | 0,01 | 0,32 |
| 14:1n-5 | 0,00 | 0,10 | 0,00 | 0,02 |
| 16:0 | 11,13 | 25,53 | 2,75 | 5,17 |
| 16:1n-9 | 0,03 | 0,26 | 0,01 | 0,05 |
| 16:1n-7 | 0,07 | 1,99 | 0,02 | 0,41 |
| 18:0 | 1,73 | 15,77 | 0,44 | 3,26 |
| 18:1trans | 0,14 | 0,68 | 0,04 | 0,14 |
| 18:1n-9c | 28,13 | 35,89 | 7,15 | 7,46 |
| 18:1n-7c | 0,56 | 1,95 | 0,14 | 0,41 |
| 18:2n-6cc | 56,32 | 13,93 | 14,40 | 2,91 |
| 18:3n-6alc | 0,01 | 0,02 | 0,00 | 0,01 |
| 20:0 | 0,31 | 0,19 | 0,08 | 0,04 |
| 18:3n-3alc | 1,13 | 0,82 | 0,29 | 0,17 |
| 20:1n-9c | 0,21 | 0,50 | 0,05 | 0,10 |
| 20:2n-6cc | 0,05 | 0,24 | 0,01 | 0,05 |
| 20:3n-6alc | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 20:4n-6alc | 0,01 | 0,04 | 0,00 | 0,01 |
| 20:5n-3alc | 0,02 | 0,04 | 0,00 | 0,01 |
| 22:4n-6alc | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 22:5n-6 | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 22:5n-3alc | 0,01 | 0,01 | 0,00 | 0,00 |
| 22:6n-3alc | 0,01 | 0,23 | 0,00 | 0,05 |
| Saturované | 13,28 | 43,27 | 0,54 | 3,65 |
| mono | 29,01 | 40,69 | 7,37 | 8,45 |
| w6 | 56,41 | 14,26 | 14,42 | 2,99 |
| w3 | 1,16 | 1,09 | 0,30 | 0,23 |
| w trans | 0,14 | 0,68 | 0,04 | 0,14 |

Tab. 3: Kompozice
mastných kyselin.

Pro dietu HFD jsou
naprosto typické n-6
nenasycené mastné
kyseliny, zvýrazněné žlutě
(18:2). Značnou část tvoří
také kyselina olejová
(18:1). V dietě HSD
převažují satureované
kyseliny (palmitová 16:0 a
stearová 18:0) a opět
kyselina olejová,
zvýrazněné modře.

3.2 Standardní laboratorní metody

3.2.1 Intraperitoneální glukózový toleranční test (IPGTT)

Tento test je obdobou glukózového tolerančního testu, který podstupují pacienti při diabetologickém vyšetření. Glukózový toleranční test na zvířatech může mít dvě podoby, IPGTT a OGTT. Při OGTT (orálním glukózovém tolerančním testu) podáváme glukózu orálně, tedy gaváží do žaludku. Při takovéto aplikaci stimulujeme výlev proteinu GLP-1 (glukagon-like peptide 1) v trávicí soustavě a sekreci inzulínu¹⁶³. Při IPGTT se glukóza aplikuje injekčně do peritonea. Laboratornímu zvířeti podáme nalačno dávku glukózy stanovenou podle hmotnosti zvířete, což zvýší glykémii a následně vyvolá výlev inzulínu, nikoliv však výlev GLP-1 jako v případě OGTT. Inzulín pak postupně snižuje glykémii zpět na bazální hladinu. Podle průběhu utilizace glukózy pak můžeme posoudit míru glukózové tolerance u jednotlivých zvířat a nepřímo také jejich citlivost k inzulínu.

a. Příprava zvířat: Den před provedením IPGTT byly myši rozděleny do samostatných klecí. Testované myši byly zváženy a na počátku tmavé periody dne jim byla odebrána potrava. Do začátku testu myši hladověly celkem 14,5 hodiny.

b. IPGTT: Po 14,5 hodinách hladovění byly testované myši zváženy, aby mohl být stanoven úbytek váhy po hladovění. Dále jim byla změřena bazální hladina glukózy – takzvaná FBG (fasting blood glucose). Glykémii byla měřena pomocí glukometru (One Touch ULTRA, LifeScan, USA) a samonasávacích detekčních proužků (One Touch ULTRA, LifeScan, USA). Přístroj jsme kalibrovali pomocí kalibračního roztoku téže značky. Jednotlivým myším pak byl v intervalu jedné minuty intraperitoneálně aplikován 10% roztok glukózy v množství 10 µl na gram váhy zvířete. Každé myši pak byla měřena glykémie po 15, 30, 60, 120 a 180 minutách od aplikace roztoku glukózy do peritonea.

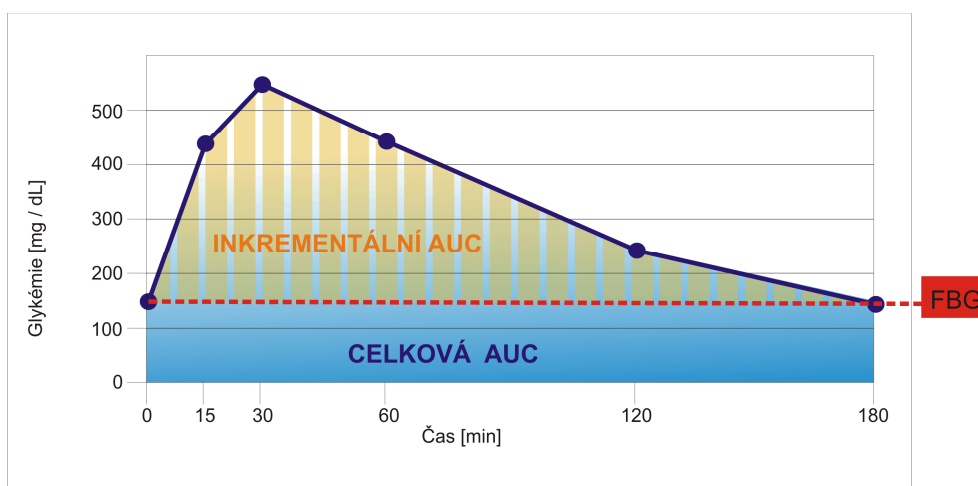
Na konci GTT byly testované myši vráceny do původních klecí s dostatečným množstvím krmiva. Po celou dobu pokusu měly všechny myši volný přístup k pitné vodě s příslušnou koncentrací metforminu.

Příprava 10% roztoku glukózy (100 ml)

- glukóza 10 g (D-+)-glukóza, Sigma, USA)
- doplníme destilovanou H₂O do celkového objemu 100 ml
- přefiltrujeme (filtr Uniflo, velikost pórů 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Německo)

c. Vyhodnocení: Hodnotili jsme úbytek váhy po hladovění a úroveň bazální hladiny glykémie. Z naměřených hodnot glykémie po aplikaci glukózy jsme pak sestavili pro

každou myš takzvanou glykemickou křivku. Na těchto křivkách jsme porovnávali strmost nárůstu v prvních 30ti minutách, která představuje rychlost s jakou se glukóza vstřebala z peritonea do krve. Dále pak strmost poklesu glykémie, která reflektuje účinnost působení inzulínu, nebo rychlost nástupu inzulínové aktivity, kterou lze charakterizovat dobou, po které začne glykémie u myši klesat. Početně jsme pak určovali hodnotu AUC, neboli obsah plochy pod křivkou, který vypovídá o celkové dynamice utilizace glukózy v krvi. Po odečtení bazální hladiny glukózy při výpočtu AUC jsme získali takzvanou inkrementální AUC, která nejlépe vypovídá o míře inzulínové rezistence. Reflektuje průběh utilizace glukózy, který je nezávislý na míře FBG (viz obr.15).



Obr. 15: Glykemická křivka

FBG – fasting blood glucose, bazální hladina glykémie. Celková AUC – plocha pod křivkou včetně bazální hladiny glykémie. Inkrementální AUC – plocha pod křivkou s odečtením bazální hladiny glykémie.

3.2.2 Odběry krve v hladovém a postprandiálním stavu

Tento způsob odběru krve umožní získat plasmu k rozboru metabolitů ve dvou zcela odlišných metabolických stavech organismu, a to jednak ve stavu hladovém, jednak ve stavu postprandiálním, tedy čerstvě nasyceném.

Myši byly před pokusem náhodně rozděleny do dvou skupin. První skupině byla krev odebírána první den v hladovém stavu, druhý den ve stavu postprandiálním, u druhé skupiny tomu bylo naopak. Myši z obou skupin byly první den ráno rozděleny do samostatných klecí s pitnou vodou obsahující příslušnou koncentraci metforminu, ale bez přístupu k potravě. Následovala světlá perioda dne, kdy myši přijímají potravu obecně mnohem méně než v noci, takže myši bez přístupu k potravě částečně vyhladověly. Na počátku tmavé periody dne po 12 hodinách hladovění byla druhé skupině (odběry

v postprandiálním stavu) potrava dodána, první skupině (odběry v hladovém stavu) pak nikoliv.

Myším ze druhé skupiny bylo po čtyřech hodinách krmení odebráno 100 μ l krve z ocasní žíly. Myším z první skupiny pak byla krev stejným způsobem odebrána o dvě hodiny později, celkem po 18 hodinách hladovění (12 hodin ve světlé fázi, 6 hodin v tmavé fázi dne). Po skončení pokusu byly myši umístěny do samostatných klecí s přísunem potravy a pitné vody s metforminem. Druhý den se pokus opakoval v tomtéž schématu s tím, že první skupině myši byla krev odebírána tentokrát v postprandiálním stavu a druhé skupině ve stavu hladovém.

Krev byla odebírána do 1,5ml mikrozkuvek s 2,5 μ l 0,5M EDTA. Poté byla centrifugována 10 min. při 5320 g a teplotě 4°C. Plasma byla uchovávána při teplotě -20°C.

3.2.3 Stanovení obsahu lipidů v plasmě a ve tkáni

V plasmě nebo v odebraných tkáních myši jsme stanovovali koncentraci TAG, cholesterolu a FFA. Koncentraci všech těchto metabolitů jsme stanovili pomocí enzymatických souprav a měření absorbance barviva, které se vytvořilo sledem reakcí hledaného metabolitu a chemikálií obsažených v příslušném reakčním činidle (viz dále). Množství barviva a tedy i míra absorbance byly pak přímo úměrné množství hledaného metabolitu ve vzorku.

a. Extrakce vzorku z odebrané tkáně: Při pitvě jsme odebrali přibližně 50 mg příslušné tkáně (s tolerancí +/- 5 mg). Tkáň byla přesně zvážena a zamražena v tekutém dusíku. Ke tkáni jsme do 1,5ml mikrozkuvky přidali 150 μ l 3M KOH (Penta, ČR) v 65% etanolu, obsah jsme důkladně promíchali na vortexu a krátce centrifugovali na stolní centrifuze. Tuto směs jsme pak inkubovali 2 hodiny při teplotě 70°C, přičemž po jedné hodině inkubace jsme obsah mikrozkuvky opět promíchali na vortexu. Po inkubaci jsme směs opět promíchali a krátce centrifugovali na stolní centrifuze. Do čisté mikrozkuvky jsme odebrali 50 μ l čistého supernatantu, vzorek naředili 10x destilovanou vodou (50 μ l vzorku + 450 μ l H₂O) a důkladně promíchali.

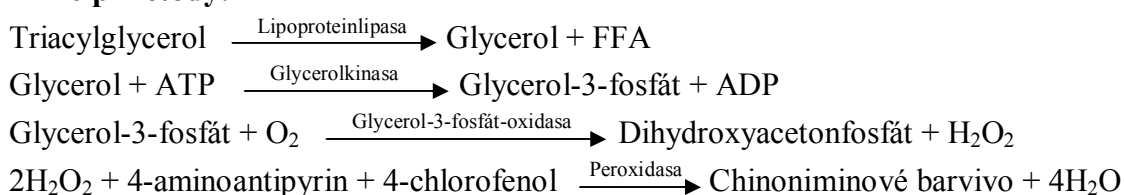
b. Stanovení koncentrace TAG, FFA a cholesterolu: Tento postup byl shodný pro vzorky plasmy i extrahované vzorky tkáně. Plastovou 96-jamkovou destičku (Nunc, Dánsko) jsme popsali následujícím způsobem: První dvě místa STANDARD, další dvě místa BLANK, dále všechny vzorky, předposlední místo STANDARD a poslední místo BLANK. Pro každý metabolit jsme použili samostatnou destičku. Jako standard jsme použili vzorek o známé koncentraci TAG a cholesterolu (Lyonorm kalibrátor Biolatest, Lachema, ČR) a vzorek o známé koncentraci FFA (Wako NEFA Standard, Wako

Chemicals, USA). Pro stanovení pozadí reakce (blank) jsme použili destilovanou vodu. Do každé jamky jsme pipetovali příslušné množství vzorku, standardu nebo vody a poté příslušné množství reakčního činidla. Protože je reakční činidlo citlivé na světlo, provedli jsme poslední krok co nejrychleji v částečně zatemněné místnosti. Destičku jsme kvůli možnému osvětlení zakryli alobalem a inkubovali 10 minut při teplotě 37°C.

Množství vzorku, popřípadě standardu nebo vody, a reakčního činidla, které jsme pipetovali do každé jamky, bylo dáno návodem k příslušnému reakčnímu činidlu (RČ).

RČ pro určení koncentrace TAG (TG L 1000, Lachema, ČR)

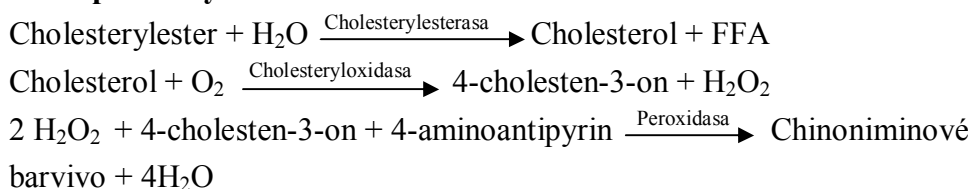
Princip metody:



Aplikujeme 3 µl vzorku + 300 µl reakčního činidla, inkubace 10 min při 37°C

RČ pro určení koncentrace cholesterolu (CHOL L 1000, Lachema, ČR)

Princip metody:



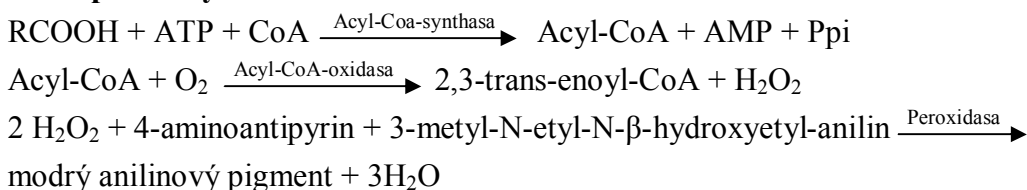
Aplikovali jsme 3 µl vzorku + 300 µl reakčního činidla, inkubace 10 min při 37°C

Postup při stanovení koncentrace FFA se od předchozích postupů mírně odlišoval. Bylo nutné pipetovat do jamek nejprve 2 µl vzorku, pak 86 µl reakčního činidla A, inkubovat 10 minut při 37°C v temnu, pak přidat 43 µl reakčního činidla B a opět inkubovat 10 minut při 37°C v temnu.

Souprava pro stanovení koncentrace FFA (NEFA-HR2, Wako chemicals, USA)

(Obsahuje reakční činidla A + B)

Princip metody



Po inkubaci jsme měřili absorbanci barviva ve vzorku na spektrofotometru Sunrise BASIC Tecan (Tecan, Švýcarsko). Koncentrace TAG a cholesterolu byla měřena při vlnové délce 500 nm, koncentrace FFA pak při vlnové délce 546 nm, což bylo opět dáno návodem k příslušnému reakčnímu činidlu. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Magellan 6.

c. Vyhodnocení: Koncentrace standardních vzorků v ředění použitým pro tento test se dle výrobce nacházela v lineární části kalibrační křivky. Proto nebylo nutné kalibrační křivku sestavovat. Výpočet koncentrace metabolitu ve vzorku (c_{vz}) jsme provedli pomocí průměrné absorbance standardních vzorků v ředění daném výrobcem kitu. Od absorbancí jednotlivých vzorků (A) byla odečtena absorbance prázdného vzorku (blank) (A_{blank}). Poté byla vypočítána koncentrace jednotlivých metabolitů pomocí absorbance standardního vzorku (A_s) se známou koncentrací TAG, FFA nebo cholesterolu (c_s).

$$A - A_{\text{blank}} = A_{\text{vz}}$$

$$c_s \times A_{\text{vz}} / A_s = c_{\text{vz}}$$

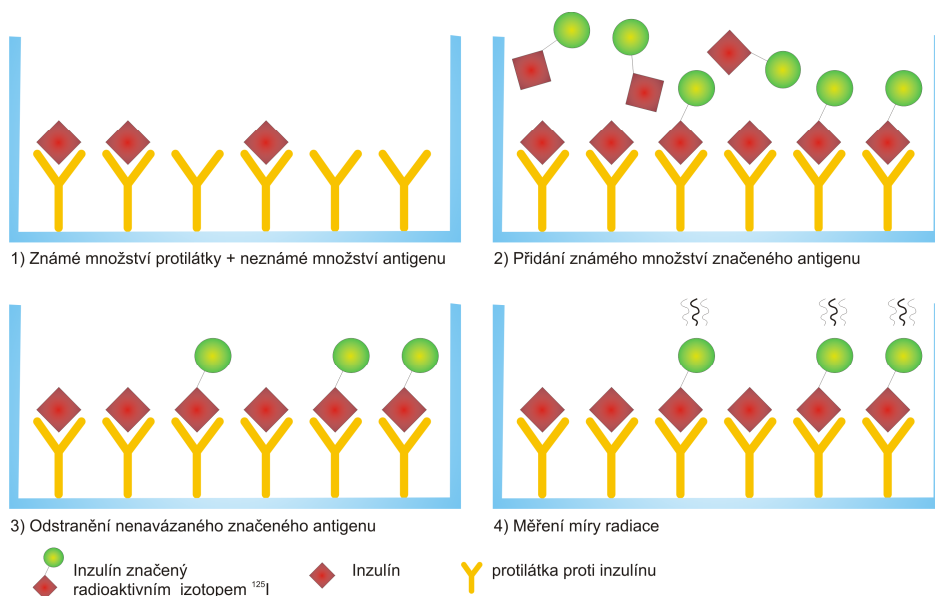
$$A - A_{\text{blank}} = A_s$$

3.2.4 Stanovení obsahu inzulinu v plasmě

Obsah inzulinu v plasmě jsme stanovovali metodou RIA (radioimmunoassay). Základním principem této metody je specifická vazba antigenu, v našem případě inzulinu, na specifickou protilátku. Roztok s primární protilátkou necháme nejprve reagovat se vzorkem plasmy o neznámém obsahu antigenu a poté s roztokem známého množství antigenu značeného radioaktivním izotopem. Značený a neznačený antigen spolu kompetují o vazbu na protilátku. Po této reakci odstraníme zbytek nenavázaného antigenu a měříme míru radiace každého vzorku. Čím více neznačeného antigenu bylo ve vzorku plasmy, tím méně značeného antigenu se navázalo na protilátku a tím menší bude naměřená míra radiace (viz obr.16). Na rozdíl od předchozí metody, v tomto případě je tedy míra radiace příslušného vzorku nepřímo úměrná množství hledaného antigenu

ve vzorku. Přesné množství antigenu pak lze stanovit po sestavení kalibrační křivky pomocí standardních vzorků s předem známou koncentrací antigenu.

Při stanovování hladiny inzulínu v plasmě jsme postupovali dle návodu k použitému komerčnímu kitu (Sensitive rat insulin RIA kit, Millipore, USA), jehož součástí jsou i všechny použité chemikálie a standardní vzorky.



Obr.16: Schéma průběhu RIA

a. Inkubace vzorku s primární protilátkou – den 1.: Připravili jsme si skleněné zkumavky s popisem K1 – K22 (pro sestavení kalibrační křivky), S1 a S2 (standardní vzorky se známou koncentrací inzulínu pro ověření kvality kitu) a dále s čísly podle počtu vzorků. Do těchto zkumavek jsme postupně pipetovali pufr, vzorky plasmy nebo standardní vzorky a roztok s primární protilátkou proti inzulínu dle následujícího schématu (viz tabulka 4). Takto připravené směsi jsme důkladně promíchali na vortexu a inkubovali 20 hodin při teplotě 4°C zakryté igelitem proti vysychání.

b. Inkubace se značeným antigenem – den 2.: Do každé zkumavky jsme aplikovali 100 μl roztoku se značeným antigenem. V našem případě to byl inzulín s navázaným radioaktivním izotopem jodu (^{125}I). Obsah zkumavek jsme opět promíchali na vortexu a inkubovali 20 hodin při teplotě 4°C .

c. Oddělení nevázaného antigenu ze směsi, měření – den 3.: Do všech zkumavek, kromě zkumavky K1 a K2 jsme aplikovali 1 ml precipitačního činidla vychlazeného na teplotu 4°C . Obsah zkumavek jsme promíchali na vortexu a inkubovali 20 min. při teplotě 4°C . Poté jsme ho centrifugovali 30 min. při 2500 g a teplotě 4°C . Po slití supernatantu zůstal ve zkumavce sediment obsahující pouze primární protilátky s navázaným antigenem, ať

už značeným nebo neznačeným. Nakonec byla v tomto sedimentu míra radiace na přístroji gamma-counter Cobra II od firmy Packard, USA.

Tab. 4: Schéma pro plnění jednotlivých zkumavek při stanovení hladiny inzulinu v plasmě, den 1.

| Zkumavka | Pufr [μl] | Vzorek [μl] | Protilátka [μl] |
|--------------|------------------|-------------|-----------------|
| K1, K2 | - | - | - |
| K3, K4 | 300 | - | - |
| K5, K6 | 200 | - | 100 |
| K7 – K22 | 100 | 100* | 100 |
| S1, S2 | 100 | 100 | 100 |
| vzorky 1 - X | 200 – m vzorku** | M** | 100 |

* Pro sestavení kalibrační křivky (zkumavky K1 – K22) byly použity standardní vzorky se známou koncentrací inzulinu, které byly součástí kitu.

** Optimální množství plasmy (m) se liší podle nutričního stavu myši, v jakém byla krev odebrána. V našem případě jsme aplikovali 20 μl plasmy a 180 μl pufru, protože krev byla odebírána v nasyceném stavu. U hladových myši by množství vzorku muselo být vyšší, aby byla hladina inzulinu stanovitelná v rámci detekčního limitu testu. Maximální množství vzorku pro daný kit je 100 μl.

d. Výpočet koncentrace inzulinu ve vzorku: Při radiometrickém zpracování byly relativní výsledky odečteny ze sestavené kalibrační křivky. Protože jsme ale kalibrační křivku sestavovali pomocí vzorků o objemu 100 μl, bylo potřeba tyto relativní výsledky přepočítat na skutečný objem vzorků (v našem případě 20 μl).

$$c \text{ inzulinu [ng / ml]} = X \cdot 100^* / 20^{**}$$

X = relativní výsledek po odečtení z kalibrační křivky

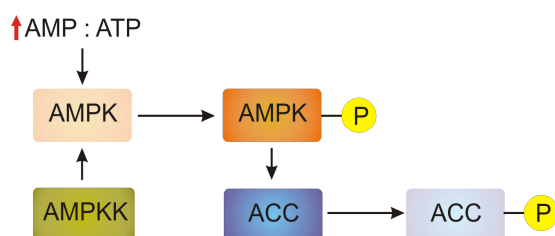
* objem standardních vzorků pro sestavení kalibrační křivky

** objem zkoumaných vzorků

3.2.5 Stanovení aktivity ACC a AMPK v jaterní tkáni

Jak aktivita AMPK, tak aktivita ACC je dána mírou fosforylace těchto proteinů. Zatímco fosforylace AMPK znamená aktivaci této kinázy, fosforylace ACC aktivitu snižuje. U obou proteinů ale platí, že míru jejich aktivace můžeme popsat jako poměr fosforylované a defosforylované formy ve vzorku. Ke kvantifikaci fosforylace těchto proteinů ve tkáni je třeba tkáň odebrat, izolovat ACC nebo AMPK od ostatních proteinů, odlišit fosforylované a defosforylované formy proteinu a nakonec zvolit vhodnou vizualizační a kvantifikační metodu. Všechny tyto kroky pak musí být prováděny tak, abychom zabránili jinak velmi snadné defosforylaci nebo degradaci proteinů působením všudypřítomných proteáz a fosfatáz.

Aktivita AMPK se běžně zjišťuje nepřímým stanovením aktivity ACC. ACC se uplatňuje při přeměně Acetyl-CoA na malonyl-CoA. Malonyl-CoA pak inhibuje karnitin-palmitoyltransferázu 1, která zajišťuje transport volných mastných kyselin do mitochondrie. ACC tedy nepřímě inhibuje přísun volných mastných kyselin do mitochondrií a tedy i jejich β -oxidaci. AMPK fosforyluje ACC, čímž ji deaktivuje a zvýší tak míru β -oxidace mastných kyselin.



Obr. 17: Vztah AMPK a ACC

AMPK je aktivována nárůstem poměru AMP:ATP při energetickém stresu ve spolupráci s další nadřazenou kinázou (AMPKK, například LKB1). Aktivovaná (fosforylovaná) AMPK fosforyluje a tím deaktivuje ACC¹⁴¹.

Jednotlivé kroky při stanovení aktivity ACC:

- 1) Odběr tkáně – freeze clamp
- 2) Extrakce proteinů z buněk
- 3) Stanovení obsahu proteinů metodou BCA
- 4) Izolace fosforylované a defosforylované ACC – gelová elektroforéza
- 5) Vizualizace a kvantifikace – western blotting

3.2.5.1 Odběr tkáně metodou „freeze clamp“

Jak již bylo řečeno, tuto metodu odběru tkáně jsme zvolili, abychom v co největší míře zabránili degradaci a defosforylaci hledaných proteinů. Pokusným zvířatům jsme okamžitě po usmrcení odebrali jeden jaterní lalok tak, že jsme ho lehce stiskli do kleští předem vychlazených v tekutém dusíku a odlomili. Odebraný vzorek jsme rychle zvážili kvůli pozdějšímu stanovení celkové hmotnosti jater a uložili do tekutého dusíku, kde jsme ho také nadále skladovali.

3.2.5.2 Izolace proteinů

Aby se při elektroforéze mohla ACC volně pohybovat gelem, je nutné rozbít cytoplasmatickou membránu buněk a ze vzorku zamražené jaterní tkáně vytvořit tekutý homogenát. Postup extrakce proteinů ze tkáně se odvíjí od toho, v jakém stavu je hledaný protein rozeznáván primární protilátkou. V případě ACC je to ve stavu denaturovaném a redukovaném. Primárního narušení tkáně je dosaženo mechanicky, konkrétně drcením a přímou sonikací. Cytoplasmatická membrána pak může být rozpuštěna i pomocí relativně

silného neiontového detergentu Triton X-100, který je obsažen v extrakčním pufru (viz dále).

a. Příprava extrakčního pufru: Úkolem jednotlivých složek extrakčního pufru je zachovat při extrakci stabilní fyziologické pH (Tris), redukční prostředí (dithiotreitol, DTT), a samozřejmě rozpustit cytoplasmatickou membránu (Triton X-100). Dalšími složkami jsou inhibitory fosfatáz (SERVA phosphatase inhibitor) a proteáz (Benzamidin, PMSF, NaF, Aprotinin, Leupeptin a Pepstatin). EDTA zde působí jako chelatační činidlo, které vyvazuje dvojmocné kovové ionty, časté kofaktory dalších degradačních enzymů. Stálost použitých enzymů je velmi omezená, proto je nutné připravit extrakční pufr maximálně 4 hodiny před začátkem extrakce a po celou dobu ho uchovávat na ledu. Při extrakci proteinů z jaterní tkáně je potřeba 500 μ l pufru na jeden vzorek.

Příprava 10 ml extrakčního pufru:

- deionizovaná H_2O – 7870 μ l
- 1M Tris, pH = 7,2 (tris[hydroxymethyl]aminometan, Sigma, USA)– 500 μ l
- 50mM EDTA (Serva, Německo) – 200 μ l
- NaCl (Merck, Německo) – 87 mg
- Benzamidin (Sigma, USA) – 2 mg
- DTT (dithiotreitol, Sigma, USA) – 2 mg
- NaF (Penta, ČR) – 500 μ l
- Ppi ($P_2O_7^{4-}$, pyrofosfát, BDH Chemicals) – 500 μ l
- 200 mM PMSF v abs. etanolu (phenylmethylsulfonyl fluorid, Sigma, USA) – 200 μ l

Po rozpuštění všech složek jsme směs přefiltrovali (filtr Uniflo, velikost pórů 0,45 μ m, Schleicher & Schuell, Německo) a dále přidali:

Triton X-100 (Serva, Německo) – 20 μ l

- Glycerol (Sigma, USA) – 100 μ l
- Aprotinin (Sigma, USA), c = 1 mg/ml, rozpuštěno v pufru HEPES– 10 μ l
- Leupeptin (Sigma, USA), c = 1 mg/ml, rozpuštěno v H_2O – 10 μ l
- Pepstatin (Sigma, USA), c = 1 mg/ml, rozpuštěno v abs. etanolu– 10 μ l
- Inhibitor fosfatáz (Phosphatase inhibitor, Serva, Německo) 100 μ l

b. Extrakce proteinů: Zmražený vzorek jaterní tkáně jsme přenesli do předem vychlazené třecí misky s tekutým dusíkem, ve které jsme ho roztřeli na prach. Poté jsme přidali 500 μ l extrakčního pufru a dále třeli, dokud se v třecí misce nevytvořila homogenní kašovitá hmota, kterou jsme přenesli do mikrozkušavky a uložili na led. Poté, co se hmota ve zkumavce částečně rozmrazila, jsme vzorek sonikovali, dokud nebyl zcela tekutý.

Vzorek jsme centrifugovali po dobu 10ti minut při 18000 g a teplotě 4°C. Supernatant jsme pak přenesli do čistých mikrozkušavek a skladovali v tekutém dusíku. Z extrahovaného vzorku jsme ještě odebrali dvě 20μl alikvóty pro stanovení celkového obsahu proteinů ve vzorku (viz dále), které jsme skladovali při teplotě – 20°C.

3.2.5.3 Stanovení obsahu proteinů metodou BCA

Metoda BCA je v současné době nejpoužívanější metodou ke zjištění celkového obsahu proteinů ve vzorku. Na rozdíl od jiných metod, například Lowryho nebo Bradfordové, je totiž kompatibilní s většinou iontových i neiontových detergentů, a nevykazuje velké odchylky na základě proteinového složení vzorku.

Skládá se ze dvou kroků. Tím prvním je takzvaná biuretová reakce, při které peptidové vazby reagují v alkalickém prostředí s měďnatými solemi za vzniku modře zbarveného komplexu. Zároveň dochází k redukci měďnatých iontů (Cu^{2+}) na ionty měďné (Cu^{1+}). Ty pak reagují s kyselinou bicinchoninovou (BCA) za vzniku purpurově zbarveného chromoforu s absorpčním maximem při 562 nm. Tento krok má za následek potenciaci předchozí barevné reakce a zvýšení detekčního limitu testu. Intenzita purpurového zbarvení je přímo úměrná koncentraci proteinů ve vzorku¹⁶⁴. Absolutní koncentraci proteinů pak můžeme určit po porovnání absorbancí vzorků s kalibrační křivkou proteinových standardů, většinou roztoků o známém obsahu bovinního sérového albuminu (BSA).

Pro stanovení aktivity ACC je kvantifikace celkového obsahu proteinů v jednotlivých vzorcích nutná z důvodu porovnatelnosti výsledků. Příprava vzorku, ať už se jedná o freeze clamp nebo extrakci proteinů, neprobíhá s kvantitativní přesností a není tedy možné zaručit, že je obsah proteinů ve všech vzorcích shodný. Po zjištění obsahu proteinů touto metodou pak můžeme jednotlivé vzorky naředit tak, aby se obsah proteinů shodoval a další naměřené hodnoty už byly porovnatelné.

a. Příprava směsi BCA a CuSO_4 : Tato směs musí být připravena těsně před provedením testu. Skládá se z roztoků A a B, které mohou být připraveny jako zásobní roztoky s dlouhou trvanlivostí. Tyto roztoky pak mícháme v poměru 50:1, přičemž na každý vzorek je potřeba 450 μl této směsi (na 100 vzorků 45 ml roztoku A : 900 μl roztoku B).

Roztok A:

- 1% disodná sůl kyseliny bicinchoninové (BCA-Na_2) (Sigma, USA)
- 2% Na_2CO_3 (Lachema, ČR)
- 0,16% vlnan sodný (Lachema, ČR)
- 0,95% NaHCO_3 (Fisher Biotech, Austrálie)
- Upraveno na pH= 11,25 pomocí 50% NaOH (Penta, ČR)

Roztok B:

- 4% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Lachema, ČR)

b. Provedení testu: Vzorky jsme před měřením naředili 20x (10 μl vzorku + 190 μl destilované H_2O). Toto ředění je nutné, aby se měřené hodnoty pohybovaly v mezích detekčního limitu testu. Vychází ze zkušeností při měření obsahu proteinů ve vzorcích jaterní tkáně v naší laboratoři. Je však možné odhadnout ho vytvořením ředící řady z několika náhodně vybraných vzorků.

Dále jsme na 96-jamkovou desku (Nunc, Dánsko) pipetovali vzorky o standardním obsahu BSA (viz tab. 5) ($c = 0,5 \text{ mg/ml}$, Sigma, USA) a naředěné vzorky v dubletech po 2,5 a 5 μl . Pro stanovení pozadí reakce (blank) jsme použili čistý extrakční pufr, který jsme opět aplikovali v množství 2,5 a 5 μl . Objem všech vzorků včetně blanku jsme doplnili destilovanou H_2O do celkového objemu 15 μl . Nakonec jsme ke všem vzorkům přidali 225 μl směsi BCA a CuSO_4 a nechali je za stálého míchání inkubovat 30 minut při teplotě 37°C . Průběh reakce jsme nakonec zastavili 5ti minutovou inkubací při teplotě 4°C .

Absorbanci vzorků jsme opět měřili na spektrofotometru Sunrise BASIC Tecan (Tecan, Švýcarsko) při vlnové délce 562 nm. Výsledky byly vyhodnoceny v programu Magellan 6. Přesnost provedení jsme ověřili porovnáním výsledků v dubletech, které se nesměly lišit o více než 10%.

Tab.5: Složení reakční směsi při tvorbě kalibrační křivky a při testování jednotlivých vzorků.

| | množství proteinů [μg] | Standard BSA (0,5 mg/ml) [μl] | H_2O [μl] | Směs A+B [μl] |
|----|--|---|--|----------------------------|
| S1 | 0 | 0 | 15 | 225 |
| S2 | 1,25 | 2,5 | 12,5 | 225 |
| S3 | 2,5 | 5 | 10 | 225 |
| S4 | 5 | 10 | 5 | 225 |
| S5 | 7,5 | 15 | 0 | 225 |

| | m proteinů [μg] | V vzorku [μl] | H_2O [μl] | Směs A+B [μl] |
|------|------------------------------|----------------------------|--|----------------------------|
| VZ x | x / 2 | 2,5 | 12,5 | 225 |
| VZ x | X | 5 | 10 | 225 |

3.2.5.4 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza se používá k oddělení jednotlivých proteinů na základě rozdílné molekulové hmotnosti. Na povrch pórovitého gelu je aplikován tekutý vzorek obsahující proteiny. Po připojení aparatury ke zdroji napětí pak gelem prochází elektrický proud, který stimuluje pohyb molekul rychlostí, která je nepřímo úměrná jejich molekulové hmotnosti. Po definovaném čase se tak proteiny rozdělí a je možné je izolovat, nebo měřit jejich množství.

Použité roztoky:

Roztok TBS (1 l roztoku)

- redestilovaná H₂O – 990 ml
- NaCl (Merck, Německo) – 9 g
- 1M Tris, pH = 7,4 (Sigma, USA) – 10 ml

Roztok TBS-T (1 l roztoku)

- redestilovaná H₂O – 990 ml
- NaCl (Merck, Německo) – 9 g
- 1M Tris, pH = 7,4 (Sigma, USA) – 10 ml
- Tween (Serva, Německo) – 1 ml

Redukční činidlo - RA (NuPAGE Sample reducing agent, Invitrogen, USA)

Pufr pro přípravu vzorků - SB (NuPAGE LDS Sample buffer, Invitrogen, USA)

Pufr pro elektroforézu - RB (Novex Tris-acetate SDS Running buffer, Invitrogen, USA)

Antioxidant (NuPAGE Antioxidant, Invitrogen, USA)

Marker pro stanovení polohy proteinů o určité molekulové hmotnosti:

- Pro proteiny od 250 kDa ($M_{ACC} = 260$ kDa) (Precision Plus Protein dual color standard, Bio-rad, USA)

Standardní vzorky o známé koncentraci ACC:

- Interní standardní vzorky s definovaným obsahem ACC

K provedení elektroforetického oddělení ACC od ostatních proteinů jsme použili komerčně dodávaný tris-acetátový gradientový gel (NuPAGE 3-8% Tris Acetate Gel 1.0 mm X 12 well, Invitrogen, USA) a elektroforetickou aparaturu od téhož výrobce.

Nejprve jsme připravili směs redukčního činidla (RA) a pufru pro přípravu vzorků (SB) v množství 5,6 μ l na jeden vzorek (4 μ l SB + 1,6 μ l RA). Tuto směs jsme smísili s extrahovanými vzorky a redestilovanou H₂O tak, abychom mohli na gel nanášet vzorky

o stejném obsahu proteinů, konkrétně o obsahu 10 µg proteinu na 15 µl vzorku. Množství extrahovaného vzorku (V_{vz}) a vody (V_{H_2O}) jsme vypočítali následujícím způsobem:

$$V_{vz} [\mu l] = 10^* / \text{obsah proteinů naměřený metodu BCA}$$

$$V_{H_2O} [\mu l] = 10,4^{**} - V_{vz}$$

* Požadované množství proteinů ve vzorku

** Celkový objem vzorku bude 16 µl (15 µl na gel + rezerva), z toho 5,6 µl tvoří směs SB + RA

Do popsaných mikrozkušavek jsme pak v tomto pořadí pipetovali 5,6 µl směsi RA+SB, vypočtené množství vody a nakonec vypočtené množství extrahovaného vzorku, který jsme před aplikací důkladně promíchali na vortexu. Stejným způsobem jsme připravili také standardní vzorky o známém obsahu ACC. Ty jsme pro kontrolu přesnosti připravili v koncentracích 5 a 10 µg proteinu/15 µl vzorku. Obsah všech mikrozkušavek jsme opět promíchali na vortexu a krátce centrifugovali. Dále jsme vzorky z důvodu denaturace proteinů vařili 12 minut ve vodní lázni.

Před průběhem samotné elektroforézy jsme dle návodu sestavili elektroforetickou aparaturu a prostor vnější nádoby vyplnili pufrem pro elektroforézu (RB), který jsme předem 20x naředili redestilovanou H_2O . Do vnějšího prostoru nádoby jsme aplikovali 600 ml RB, do prostoru mezi gely pak 200 ml RB s přídavkem 500 µl antioxidantu. Na takto připravené gely jsme aplikovali vzorky zleva doprava v tomto pořadí:

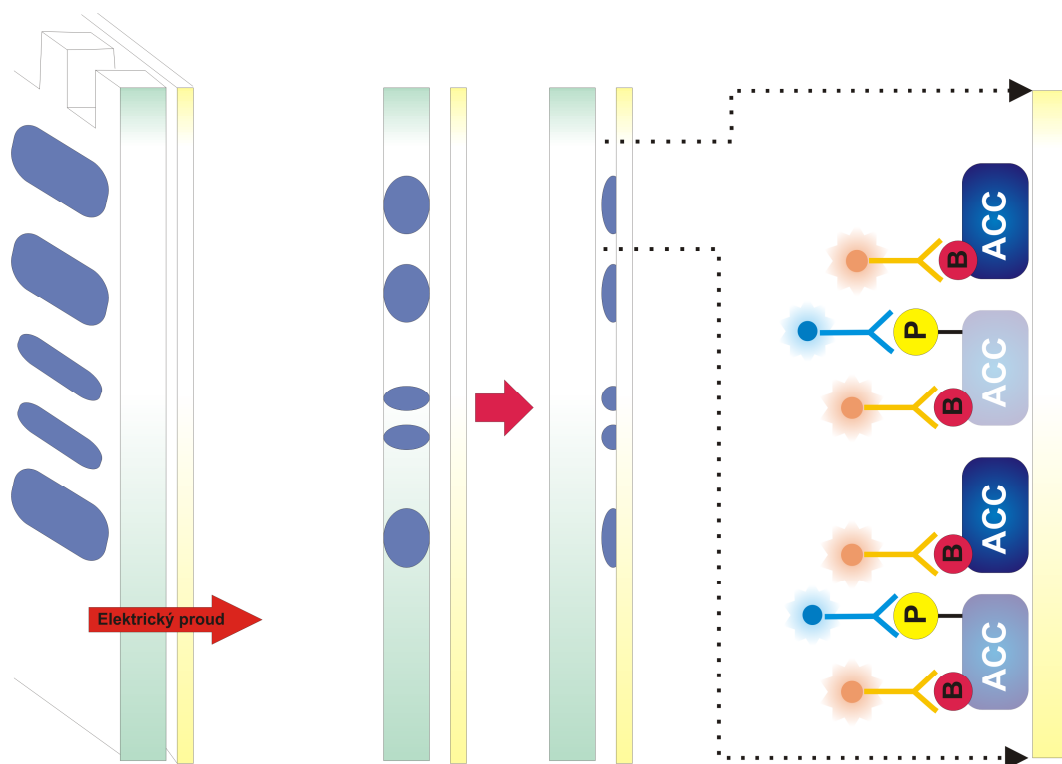
1. pozice: Marker (6 µl)
2. – 5. pozice: Vzorky 1 – 4 (15 µl)
6. pozice: Standardní vzorek o obsahu 5 µg proteinu / vzorek (15 µl)
7. pozice: Standardní vzorek o obsahu 10 µg proteinu / vzorek (15 µl)
8. – 11. pozice: Vzorky 5 – 8 (15 µl)
12. pozice: Marker 3 µl

Aplikace různých koncentrací markerů a standardů nám později pomohla určit správnou orientaci gelu. Po aplikaci všech vzorků jsme elektroforetickou aparaturu připojili ke zdroji napětí ($U = 150V$) a nechali elektroforézu probíhat přibližně 1 hodinu (dokud kontrolní pigment značící „čelo“ průběhu elektroforézy nevyšel zcela ven z gelu).

3.2.5.5 „Western blotting“

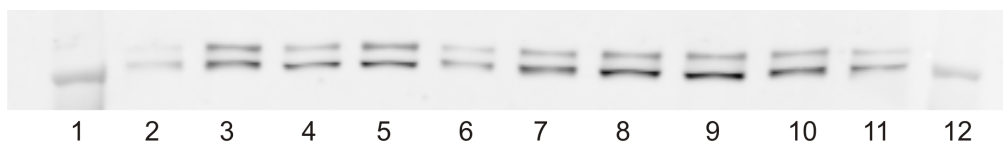
Po oddělení proteinů elektroforézou již pro stanovení aktivity ACC zbývá jen vizualizovat a kvantifikovat množství fosforylovaných a defosforylovaných proteinů. Metoda „Western blotting“ umožní přenést proteiny z elektroforetického gelu na speciální adhezivní membránu pomocí elektrického proudu, který proudí směrem od gelu

k membráně a stimuluje tak pohyb proteinů podobně jako při elektroforéze. Na membráně pak můžeme proteiny specificky barvit, v tomto případě pomocí protilátek značených fluorescenčními sondami. Za použití speciálního scanneru pak fluorescenční sondy excitujeme, čímž dojde k uvolnění světelného kvanta o příslušné vlnové délce s intenzitou, která je přímo úměrná koncentraci proteinů na membráně. Množství fosforylované a defosforylované formy ACC pak zjistíme při použití specifických protilátek značených různými fluorescenčními sondami, jejichž aktivitu pak můžeme detekovat zvlášť excitací světlem o různých vlnových délkách. (viz obr.18) Membrána je přímo při excitaci skenována a tento obrázek je pak převeden do běžného formátu počítačové grafiky. Intenzitu fluorescenčního záření pak můžeme denzitometricky vyhodnotit v grafickém programu (viz obr.19).



Obr:18 Schéma Western blottingu ACC

Při průchodu elektrického proudu se proteiny pohybují směrem od gelu k membráně, na kterou posléze adherují. Po vyříznutí části membrány, která obsahuje pouze fosforylované a defosforylované formy ACC, je membrána inkubována nejprve s primárními protilátkami proti fosforylované ACC (modré). Poté je membrána inkubována se sekundárními značenými protilátkami (světle modré) a se značeným streptavidinem (oranžové). Streptavidin je protilátkou proti biotinu (B), vždy přítomnému kofaktoru ACC. Pomocí této protilátky můžeme stanovit celkovou koncentraci ACC. Přímou tak můžeme změřit koncentraci fosforylované formy ACC, kterou odečteme od celkové koncentrace ACC, abychom zjistili koncentraci defosforylované formy.



Obr. 18: Ukázka naskenované části membrány (Měřeno při vlnové délce 700 nm)

Na pozicích 1 a 12 se nachází marker. Silný proužek ukazuje pozici proteinů o velikosti 250 kDa. Na pozicích 6 a 7 se nachází standardní vzorky o dvou různých koncentracích proteinů. Ostatní pozice jsou pak zaplněny testovanými vzorky. U sacců se ACC vyskytuje ve dvou izoformách, ACC1 a ACC2, což je pravděpodobně důvodem, proč na membráně vidíme dva oddělené proužky. Při vyhodnocování však pracujeme pouze se spodním proužkem (viz instrukce výrobce protilátek).

a. Přenos proteinů z gelu na membránu: Před provedením samotného „blottování“ jsme si nastříhali membrány (Immobilion-FL Transfer membrane, PVDF 0,45 μ m, Millipore, USA) a filtrační papíry (Whatman, Velká Británie, 3MM) o rozměrech 7,5 x 8,5 cm. Při manipulaci s filtračním papírem i membránou jsme používali ochranné fólie a pinzetu s hladkým povrchem, abychom zabránili znečištění a poškození povrchu membrány. Na každý blottovaný gel byla potřeba jedna membrána a dva kousky filtračního papíru. Dále jsme si připravili roztok transferového pufru (TB). Jeho přesné složení se odvíjelo od toho, jestli jsme v jedné aparatuře prováděli přenos proteinů z jednoho, nebo ze dvou gelů najednou.

Tab. 6: Složení roztoku transferového pufru pro přenos proteinů z jednoho, nebo dvou gelů.

| | Na 1 gel | Na 2 gely |
|--|----------|-----------|
| Transferový pufr ředěný 20x v redestilované H ₂ O (NuPAGE Transfer buffer, Invitrogen, USA) | 50 ml | 50 ml |
| Metanol (Lachema, ČR) | 100 ml | 200 ml |
| Redestilovaná H ₂ O | 850 ml | 750 ml |
| Antioxidant (NuPAGE Antioxidant, Invitrogen) | 1 ml | 1 ml |

Membrány jsme před použitím inkubovali 15 vteřin v metanolu, 2 minuty v redestilované H₂O a minimálně 5 minut v TB na třepačce. Do blottovací aparatury jsme poté skládali jednotlivé komponenty vždy předem namočené v TB v tomto pořadí: 2x pěnová houbička, filtrační papír, elektroforetický gel, membrána, filtrační papír, 2x pěnová houbička. Při blottování dvou gelů najednou jsme jako mezivrstvu použili další pěnovou houbičku. S membránou i filtračním papírem jsme stále manipulovali pouze pomocí hladké pinzety. Skleněnou tyčinkou jsme vytlačovali vzduchové bubliny, které uvízly mezi jednotlivými vrstvami. Poté jsme blottovací aparaturu upevnili do vnější nádoby pro elektroforézu a doplnili až po okraj roztokem TB. Prostor vně blottovací aparatury jsme

vyplnili 650 ml H₂O vychlazené na 4°C. Takto připravenou aparaturu jsme připojili ke zdroji napětí (U=34 V) a nechali přenos probíhat přesně 2 hodiny.

Po skončení přenosu jsme membránu vyjmuli a důkladně ji propláchli ve 12 ml roztoku TBS. Následovala 5ti minutová inkubace ve 12 ml TBS a 60ti minutová inkubace v 6 ml TBS + 6 ml blokovacího pufru (Odyssey Blocking buffer (20x) r.t.u., Li-cor, USA), obojí za stálého pozvolného míchání. Touto procedurou jsme dosáhli vytvoření silných ireversibilních vazeb mezi proteiny a membránou.

b. Značení primárními protilátkami: Pomocí markeru jsme určili oblast membrány, kde se nacházejí proteiny o velikosti 250 kDa, což přibližně odpovídá velikosti ACC.

Skalpelem jsme pak z membrány vyřízli proužek o šířce cca 1,5 cm se středem v této oblasti. Tento proužek jsme pak inkubovali přes noc při teplotě 4°C v roztoku, skládajícím se z 1,5 ml TBS-T, 1,5 ml blokovacího pufru a primární protilátky proti fosforylované formě ACC (množství bylo určeno tak, aby bylo dosaženo předepsaného ředění). V našem případě byla použita protilátka ACC: Mouse anti-phospho-Acetyl CoA Carboxylase, clone BK102, Millipore, USA v ředění 1:500

c. Značení sekundárními protilátkami a streptavidinem: Druhý den jsme proužky membrány promyli roztokem TBS-T a dále za stálého míchání v tomtéž roztoku inkubovali 5x 5 minut. Po promývání následovala inkubace se značenými sekundárními protilátkami a značeným streptavidinem. Abychom zachovali funkčnost fluorescenčních sond, pracovali jsme od tohoto okamžiku v zatemněné místnosti a všechny inkubace jsme prováděli v nádobách zcela zakrytých hliníkovou fólií. Proužky membrány jsme inkubovali po dobu 1 hodiny za stálého míchání v roztoku obsahujícím 1,5 ml TBS-T, 1,5 ml blokovacího pufru, sekundární protilátku Alexa Fluor 680 Goat-anti-mouse IgG, Molecular probes, ředění 1:5000 a streptavidin IRDye 800 conjugated Streptavidin, Rockland, ředění 1:5000. Nakonec jsme membránu proplachovali ještě 5x 5 minut v TBS-T a 1x 10 minut v roztoku TBS.

d. Vyhodnocení: Obarvenou membránu jsme skenovali na scanneru Odyssey firmy Li-cor, USA. Zvlášť jsme snímali emisi světla o vlnové délce 700 nm (sonda na protilátce proti fosforylované ACC) a 800 nm (sonda na streptavidinu). V počítačovém programu Aida jsme pak denzitometricky změřili intenzitu zbarvení všech proužků. Abychom mezi sebou mohli srovnávat výsledky z různých gelů, vztáhli jsme výsledné hodnoty na standardní vzorky.

$$X = I \cdot (ST10 / ST5) / (ST10 + ST5)$$

X – relativní výsledek pro vzorek X, který můžeme srovnávat se vzorky z ostatních gelů

I – intenzita zbarvení proužku naměřená v programu Aida

ST5 – intenzita zbarvení proužku odpovídajícího standardnímu vzorku o obsahu 5 mg proteinů

ST10 – intenzita zbarvení proužku odpovídajícího standardnímu vzorku o obsahu 10 mg proteinů

Aktivitu ACC (A_{ACC}) jsme vyjádřili jako poměr defosforylované a fosforylované formy ACC.

$$A_{ACC} = X_{800} - X_{700} / X_{700}$$

Číslo v dolním indexu značí, při jaké vlnové délce byla daná hodnota naměřena (800 nm – celková ACC, 700 nm – fosforylovaná ACC)

3.3 Statistické vyhodnocení výsledků

Statistickou analýzu dat byla provedena v programu Sigma Stat 3.1 od firmy Systat Software, USA. Za předpokladu normálního rozložení jsme data vyhodnocovali párovým t-testem, případně jednocestnou ANOVOU. Hladina statistické významnosti byla stanovena na $p < 0,05$. Všechny výsledné hodnoty jsou prezentovány jako výběrové průměry a variability jsou vyjádřeny jako střední chyby výběrového průměru (SE).

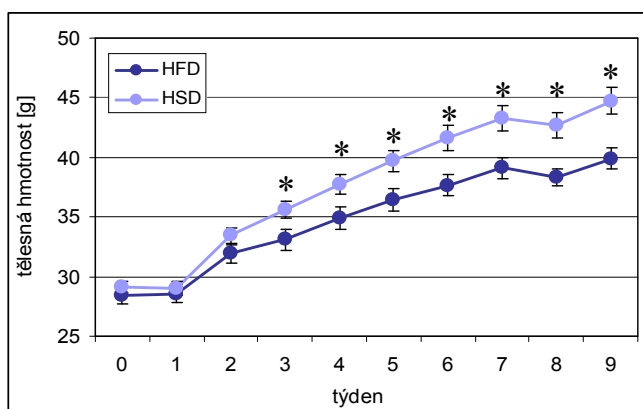
4 Výsledky

4.1 Pokus č.1: Porovnání metabolických účinků diet HFD a HSD

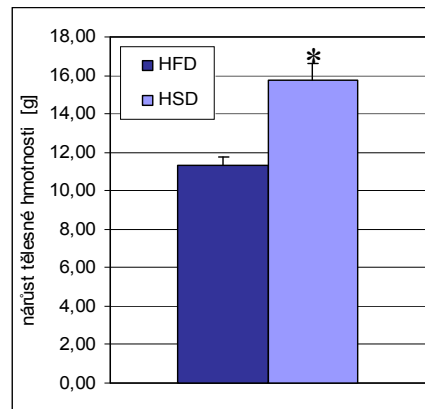
V tomto pokusu byly porovnávány dvě skupiny myší ($n=10$), které se mezi sebou lišily obezitogenní dietou. Jednalo se o experimentální diety HFD a HSD (viz. 3.1.1 Experimentální diety). Obezita a s ní spojené metabolické poruchy byly u myší indukovány osmitýdenní aplikací experimentálních diet. V 7. týdnu byl proveden IPGTT, na počátku 9. týdnu pak proběhlo usmrcení myší se současným odběrem vzorků tkání pro další analýzy.

4.1.1 Spotřeba diety a nárůst tělesné hmotnosti

V průběhu celého pokusu byla monitorována tělesná hmotnost myší a spotřeba diety. Změny tělesné hmotnosti jsou dobrým ukazatelem metabolických změn. Je však nutné posoudit, jestli ke změně tělesné hmotnosti nedošlo pouze v návaznosti na změnu v příjmu potravy.



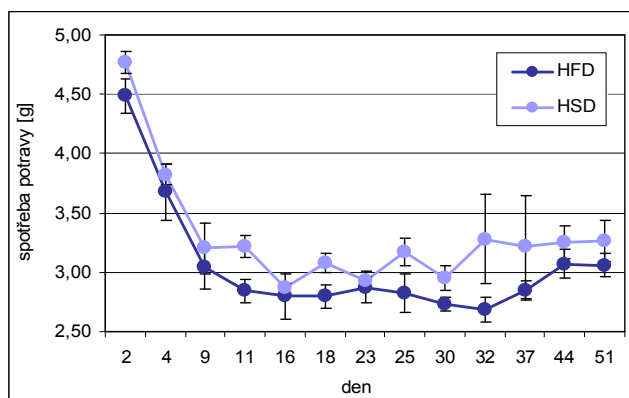
Graf 1.: Průběh nárůstu tělesné hmotnosti v čase



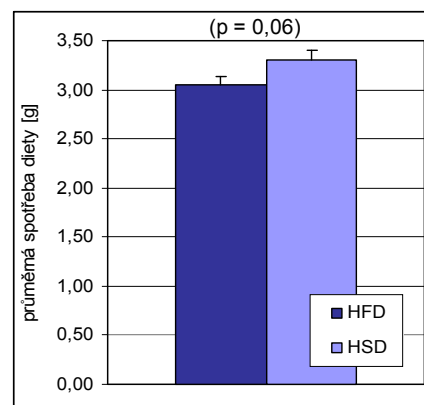
Graf 2.: Absolutní nárůst tělesné hmotnosti od začátku pokusu do pitvy, * $p < 0,001$

Graf 1 ukazuje nárůst tělesné hmotnosti myší v čase. Experimentální diety byly podávány od 1. týdne. Příčinou poklesu hmotnosti v 8. týdnu je provedení IPGTT v 7. týdnu. Opětovný nárůst naznačuje, že se myši po IPGTT dostatečně zotavily. Na konci pokusu vážily myši ze skupiny HSD výrazně více, než myši ze skupiny HFD. Signifikantně vyšší ($p < 0,001$) byl i jejich absolutní váhový přírůstek, který vyjadřoval nárůst hmotnosti myší od 1. do počátku 9. týdne (graf 2). Rozdíl mezi spotřebami diet byl na hranici signifikance ($p = 0,06$, graf 4). Při pohledu na graf vyjadřující spotřebu diety

v průběhu pokusu (graf 3) je však patrné, že mírně zvýšená spotřeba potravy přetrvávala u skupiny HSD po celou dobu pokusu. Vzhledem k tomu, že jsou diety izoenergetické, mohl se tento fakt do značné míry podepsat na konečném rozdílu hmotností myší.



Graf 3.: Průběh spotřeby diety v čase

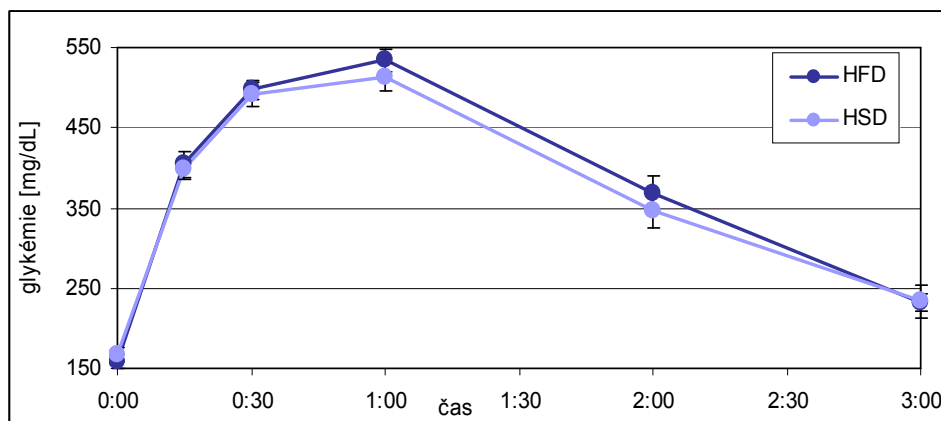


Graf 4.: Průměrná spotřeba diety v průběhu celého pokusu

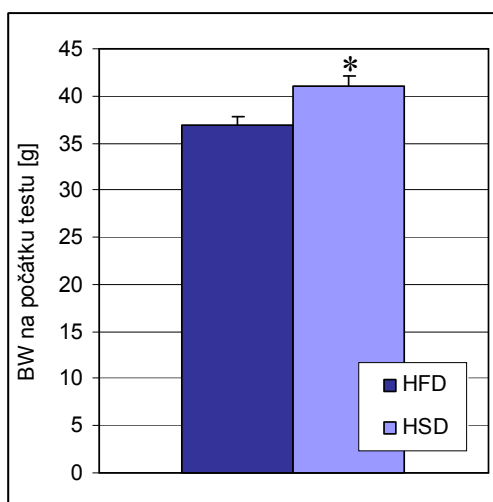
Souhrn: Myši krmené dietou HSD přibraly na váze signifikantně více, než myši krmené dietou HFD. Tento přírůstek však mohl být ovlivněn nepatrně zvýšeným příjmem potravy.

4.1.2 Posouzení míry glukózové tolerance metodou IPGTT

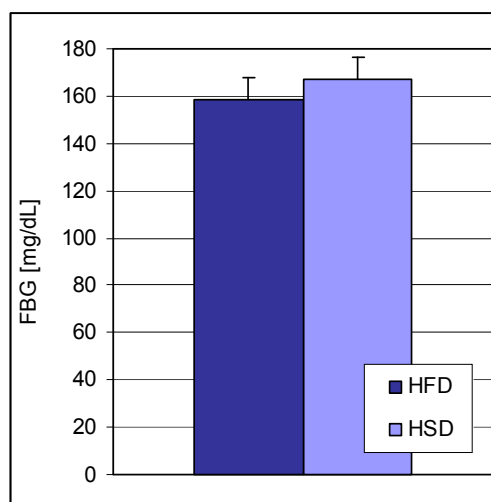
Do testu vstupovaly 2 skupiny myší s rozdílnou průměrnou hmotností (viz Graf 6). Tento fakt mohl výrazně ovlivnit všechny ostatní výsledky IPGTT. I přes to, že rozdíl v tělesné hmotnosti mezi skupinami byl signifikantní ($p = 0,007$), ostatní parametry, tedy celková AUC, inkrementální AUC ani bazální hladina glukózy, se mezi skupinami významně nelišily (viz grafy 7, 8 a 9). Totéž můžeme pozorovat také při porovnání glykemických křivek (viz Graf 5).



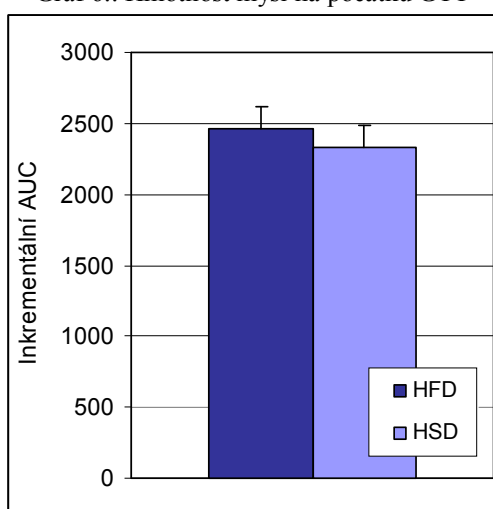
Graf 5.: Glykemické křivky



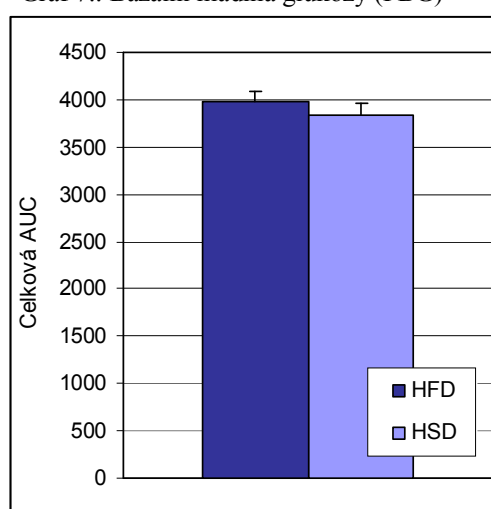
Graf 6.: Hmotnost myši na počátku GTT



Graf 7.: Bazální hladina glukózy (FBG)



Graf 8.: Inkrementální plocha pod křivkou

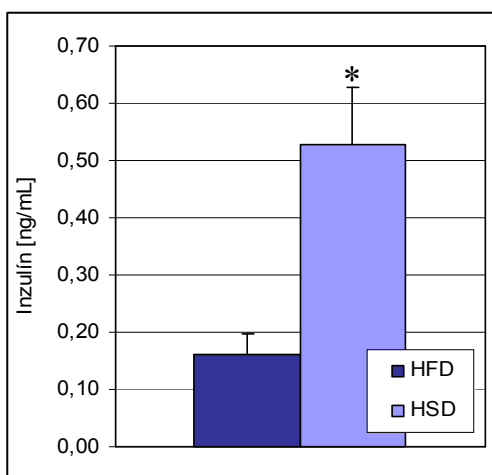


Graf 9.: Celková plocha pod křivkou

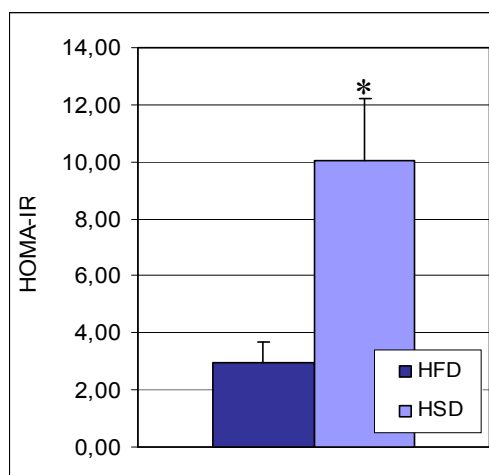
Abychom mohli posoudit míru inzulínové rezistence (IR), odebrali jsme myším v lačném stavu před začátkem GTT 80 μ l krve z ocasní žíly pro stanovení obsahu inzulínu v plasmě (viz Graf 10). Ke kvantifikaci míry IR je často používán takzvaný HOMA-IR index (Homeostasis model assessment), v jehož výpočtu je zahrnuta jak hladina inzulínu v krvi nalačno (FBI, fasting blood insulin), tak bazální hladina glukózy (FBG).

$$\text{HOMA-IR} = (\text{FBG [mg/dL]} \times \text{FBI [\mu U/ml]}) / 405$$

Skupina HSD měla signifikantně vyšší jak průměrnou koncentraci inzulínu v plasmě nalačno ($p = 0,03$), tak hodnotu HOMA-IR indexu ($p = 0,007$, graf 11). Tyto výsledky spolu s výsledky glukózového tolerančního testu naznačují, že myši ve skupině HSD mají vyšší inzulínovou rezistenci a k udržení stejné glykémie musí pravděpodobně sekretovat více inzulínu než myši ve skupině HFD.



Graf 10.: Hladina inzulínu nalačno

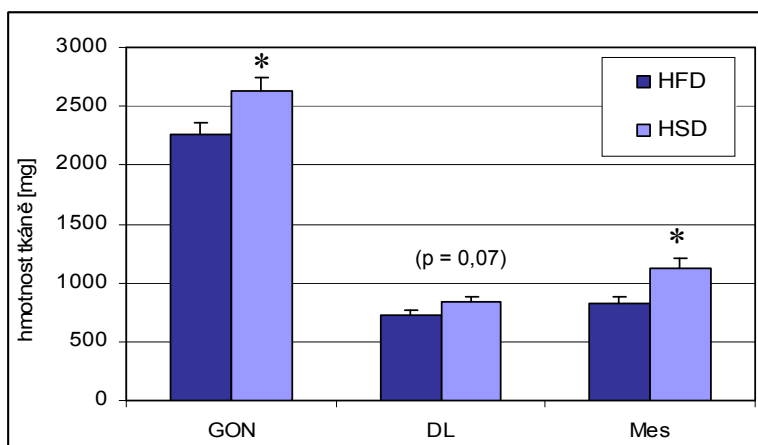


Graf 11.: Hodnoty HOMA-IR indexu

Souhrn: Ačkoliv měly myši ve skupině HSD v době provedení GTT signifikantně větší hmotnost, než myši ze skupiny HFD, nepozorovali jsme u nich zhoršenou glukózovou toleranci. Hladina inzulínu nalačno byla však u skupiny HSD výrazně vyšší, což spolu s hodnotami HOMA-IR indexu naznačuje, že byly myši ze skupiny HSD výrazně rezistentnější vůči inzulínu.

4.1.3 Analýza tkání *ex vivo*

Při pitvě byly všechny tkáně, důležité z hlediska metabolismu, váženy (viz grafy 12, 13 a 16). Hmotnost gonadálního tukového depa byla signifikantně vyšší u skupiny HSD ($p = 0,018$, graf 12), stejně jako hmotnost depa mesenterického ($p = 0,015$, graf 12). Rozdíl v hmotnosti podkožního dorso-lumbálního tukového depa odpovídal témuž trendu a nacházel se na hranici statistické významnosti ($p = 0,07$). Skupina HSD se tedy vyznačovala vyšším obsahem tělesného tuku, než skupina HFD.

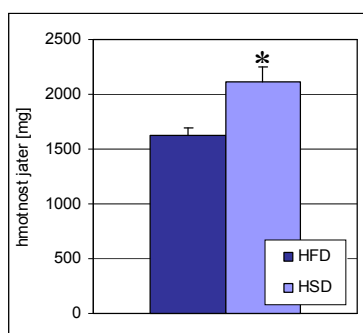


Graf 12.: Hmotnosti hlavních tukových dep
GON – gonadální tuk. depo
DL – dorso-lumbální tuk. depo
Mes – Mesenterické tuk. depo

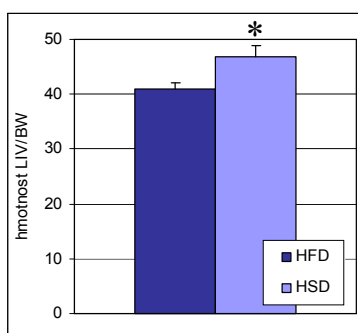
U jater, hnědé tukové tkáně (BAT) a kosterního svalu byl kromě hmotnosti tkáně měřen také obsah triacylglycerolu (TAG). Tento údaj vypovídá o míře ukládání ektopického tuku.

Játra myši ze skupiny HSD byla výrazně těžší než játra myši ze skupiny HFD ($p = 0.009$, graf 13). Zvyšování hmotnosti jater obvykle doprovází jejich metabolické zatížení a poškození. Nicméně velikost orgánů většinou koreluje s celkovou hmotností organismu. Případný nárůst hmotnosti jater, který nevychází pouze ze změny tělesné hmotnosti, lze odmaskovat vztažením hmotnosti jater na gram tělesné váhy. Rozdíl mezi skupinami ale zůstal i po tomto přepočtu statisticky významný ($p = 0,024$), což svědčí o tom, že játra myši ve skupině HSD byla poškozena výrazně více, než játra myši ve skupině HFD (graf 14).

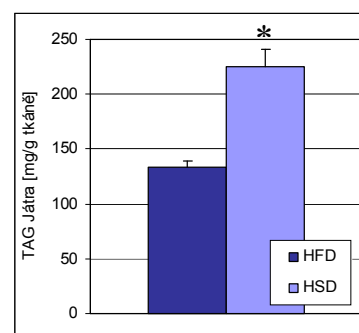
Jaterní steatóza je u lidí diagnostikována, když obsah TAG překročí 5 % hmotnosti jater¹⁶⁵. Jak ukazuje graf 15., u myši ve skupině HFD tvořil tuk v průměru 13,3 % hmotnosti jater, u myši ve skupině HSD to pak bylo průměrně 22,5 %. U obou skupin tedy aplikace obezitogenní diety vyvolala rozvoj jaterní steatózy. U myši ve skupině HSD byla jaterní steatóza natolik výrazná, že bylo možné pozorovat ji makroskopicky jako žluté mramorování na jinak jednolitě sytě růžové jaterní tkáni.



Graf 13.: Hmotnost jater



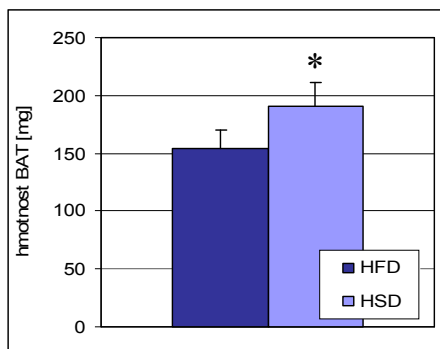
Graf 14.: Normalizovaná hmotnost jater (m jater/ tělesná hmotnost)



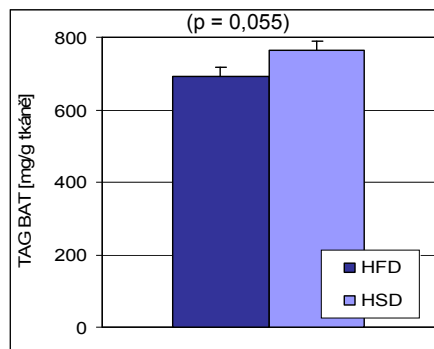
Graf 15.: Obsah triacylglycerolu (TAG) na gram jaterní tkáně

Hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT) byla u skupiny HSD také vyšší, a ačkoliv tento rozdíl nebyl statisticky významný, odpovídal trendu pozorovanému u ostatních tukových tkání ($p = 0,177$, graf 16). Tento nárůst hmotnosti BAT však pravděpodobně nebyl způsoben zvýšenou metabolickou aktivitou, jako tomu bývá například při adaptaci hlodavců na chlad, ale zvýšeným ukládáním ektopického tuku, jak ukazuje graf 17. Myši ze skupiny HSD měly vyšší obsah TAG v hnědé tukové tkáni, přičemž tento rozdíl byl na hranici signifikance ($p = 0,055$, graf 17).

Souhrn: Skupina HSD se vyznačovala vyšším obsahem tuku ve všech tukových depech a signifikantně zvýšenou hmotností jater, což spolu s velmi vysokým obsahem TAG v této tkáni ukazuje na metabolické poškození.



Graf 16.: Hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT)

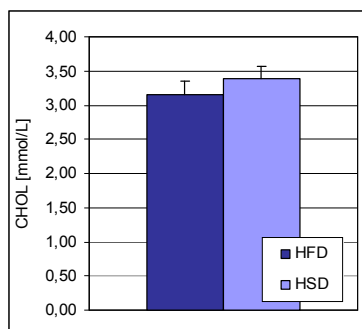


Graf 17.: Obsah triacylglycerolu (TAG) na gram hnědé tukové tkáně (BAT)

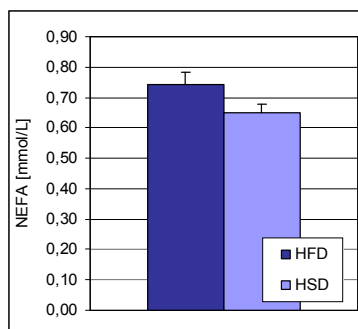
4.1.4 Stanovení obsahu lipidových metabolitů v plasmě

Dále byl stanoven obsah lipidových metabolitů, konkrétně cholesterolu (CHOL), volných mastných kyselin (FFA) a triacylglycerolu (TAG), v plasmě. Krev byla odebírána podstřížením krční tepny při pitvě. Myši před pitvou nehladověly, nicméně je známo, že příjem potravy probíhá u myši převážně v noci. Během světlé periody dne jsou pak myši převážně v klidu a potravu přijímají pouze příležitostně. Pitva proběhla během dopoledne, a proto složení lipidových metabolitů v plasmě nemělo být ovlivněno akutním příjmem potravy.

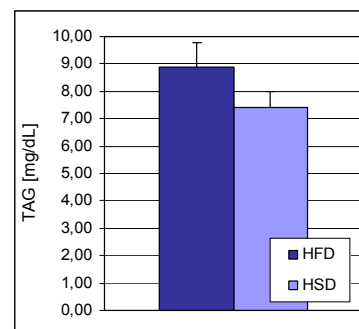
Jak ukazují grafy 18, 19 a 20, rozdíly v obsahu lipidových metabolitů v plasmě v post-absorpčním stavu nebyly statisticky významné, nicméně u obsahu FFA ($p = 0,08$) a TAG ($p = 0,193$) byl naznačen trend ke zvyšování hladiny těchto metabolitů v plasmě myši ze skupiny HFD.



Graf 18.: Obsah cholesterolu (CHOL) v plasmě



Graf 19.: Obsah volných mastných kyselin (FFA) v plasmě



Graf 20.: Obsah triacylglycerolu (TAG) v plasmě

Souhrn: Obsah lipidových metabolitů byl u obou skupin myši podobný. Mírné zvýšení obsahu FFA a TAG v plasmě myši ze skupiny HFD nebylo statisticky významné, odpovídalo však prokázané nižší míře ukládání ektopického tuku do jater.

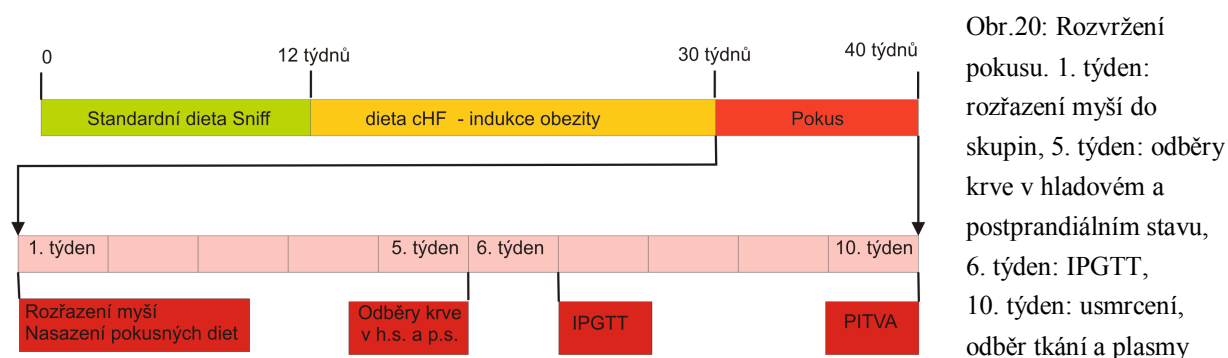
4.2 Pokus č.2: Porovnání účinků různých dávek metforminu na pozadí diet HFD a HSD

V tomto pokusu bylo porovnáváno celkem osm skupin myši ($n = 6$). Základem byly dvě skupiny, testované v pokusu č.1, tedy skupiny na experimentální dietě HFD a HSD. Na pozadí těchto diet pak byly aplikovány 3 různé dávky metforminu (50, 200 a 400 mg / kg tělesné hmotnosti / den, dále jen mg/kg BW/den). Zařazeny byly také skupiny kontrolní, které byly krmeny příslušnou experimentální dietou, ale metformin nepřijímaly. U všech myši byl tříměsíční aplikací obezitogenní diety cHF (složení odpovídá dietě HFD) vyvolán rozvoj obezity a s ní asociovaných metabolických poruch. Samotný pokus pak trval 10 týdnů, během nichž myši přijímaly příslušnou experimentální dietu a stanovenou dávku metforminu.

Na počátku pokusu bylo vybráno 48 myši s největším nárůstem hmotnosti v důsledku konzumace diety cHF. Tyto myši byly rozděleny do skupin tak, aby se průměrná hmotnost myši mezi skupinami lišila co nejméně. Rozdělení myši do skupin je znázorněno v tabulce 7. Průběh pokusu č.2 a zařazení jednotlivých testů jsou pak znázorněny na obrázku 20.

Tab. 7: Rozdělení pokusných skupin

| Skupina (Označení v pokuse) | Pokusná dieta | Dávka metforminu [mg / kg BW] za den |
|--|----------------------|---|
| 1 (HFD M0) | HFD | 0 |
| 2 (HFD M50) | HFD | 50 |
| 3 (HFD M200) | HFD | 200 |
| 4 (HFD M400) | HFD | 400 |
| 5 (HSD M0) | HSD | 0 |
| 6 (HSD M50) | HSD | 50 |
| 7 (HSD M200) | HSD | 200 |
| 8 (HSD M400) | HSD | 400 |



4.2.1 Stanovení skutečné dávky metforminu

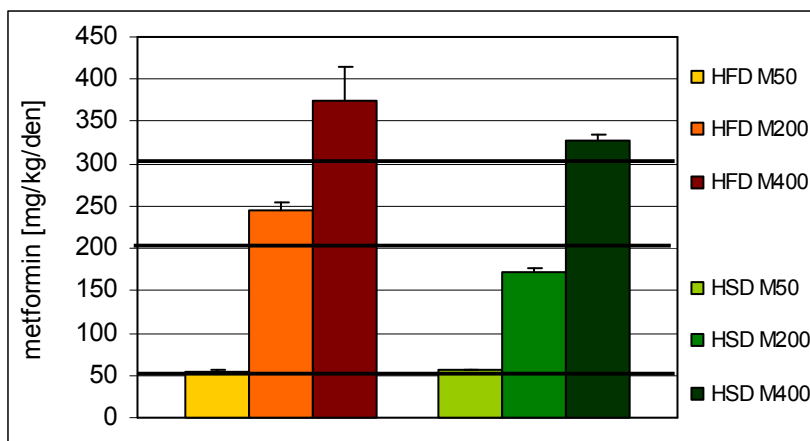
V základním schématu pokusu byly navrženy tři dávky metforminu: 50, 200 a 400 mg/kg BW/den. Metformin byl podáván v pitné vodě a jeho koncentrace byla určena podle průměrné spotřeby vody jednou myší za den a průměrné hmotnosti myši na začátku pokusu. Po opakovaném měření byla stanovena průměrná denní spotřeba vody na **2,9 ± 0,1 ml/myš/den**.

Hmotnost myši se však v průběhu pokusu měnila. Měnila se i spotřeba vody, pravděpodobně v závislosti na míře příjmu potravy a na váze. Všechny tyto faktory nebylo při přípravě roztoku s metforminem možné zohlednit především proto, že myši byly chovány v klecích po třech jedincích, jejichž hmotnosti se v průběhu pokusu různily kvůli heterogenní odpovědi na léčbu metforminem. Proto byla na konci pokusu stanovena skutečná spotřeba metforminu porovnáním průměrné hmotnosti myši v jednotlivých klecích (TH_A [g]), průměrné spotřeby vody na klec (SV_A [ml/myš/den]) a koncentrace metforminu ve vodě (c_m [mg/ml]).

Výpočet:

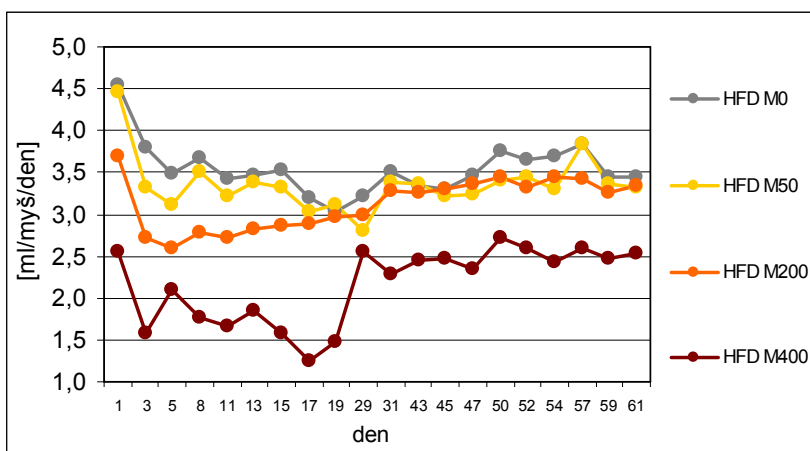
$$\text{Skutečná dávka metforminu [mg/kg/den]} = SV_A \cdot c_m \cdot 1000 / TH_A$$

V průběhu pokusu se značně měnila jak hmotnost myši, tak spotřeba pitné vody s metforminem (graf 22 a 23). Po výpočtu je však patrné, že se podařilo dosáhnout stanovených dávek (graf 21). V rámci skupin na jedné experimentální dietě můžeme dále rozlišovat tři dávky metforminu. Na různých dietách pak můžeme porovnávat dávku nejvyšší a nejnižší, které dosahují mezi skupinami přibližně stejných hodnot. U prostřední dávky je nutné zohlednit fakt, že myši na dietě HSD přijímaly v průběhu pokusu přibližně o 100 mg metforminu/kg/den méně než myši na dietě HFD. Skutečné dávky byly tedy u skupin na dietě HFD v průměru 54, 245 a 376 mg/kg/den, u skupin na dietě HSD pak 56, 171 a 327 mg/kg/den.

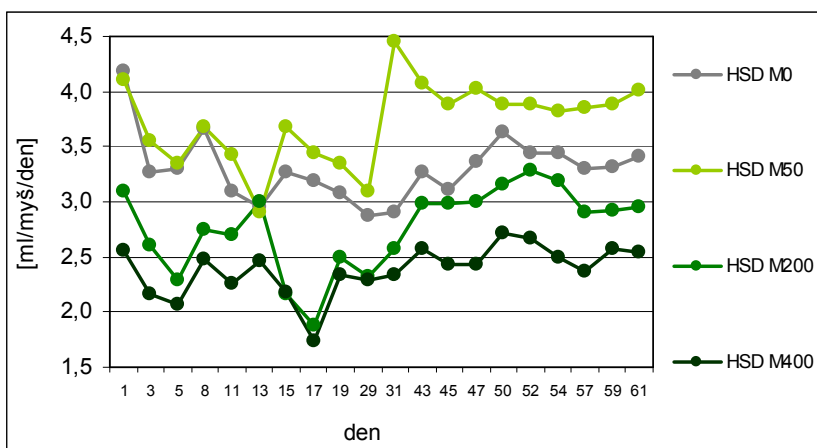


Graf 21.: Skutečná spotřeba metforminu.

Silnými čarami jsou znázorněny plánované dávky metforminu: 50, 200 a 400 mg/kg/den



Graf 22.: Spotřeba vody u myši na dietě HFD.

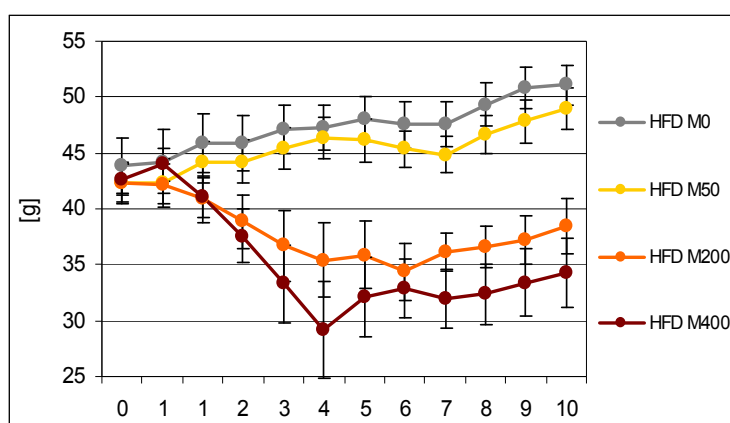


Graf 23.: Spotřeba vody u myši na dietě HSD.

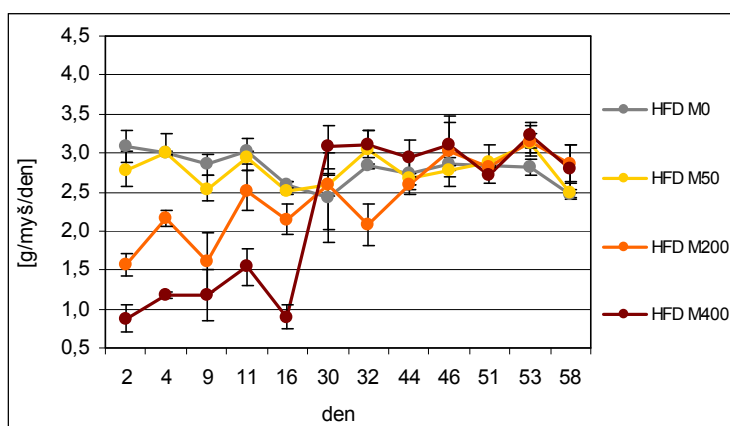
4.2.2 Spotřeba diety a nárůst tělesné hmotnosti

Stejně jako v pokuse č. 1 jsme i nyní monitorovali po celou dobu pokusu změny v tělesné hmotnosti a spotřebu potravy. Z grafu 28, který zobrazuje absolutní nárůst tělesné hmotnosti od začátku pokusu do pitvy, je patrné, že s výjimkou nejnižší dávky vyvolala aplikace metforminu signifikantní snížení tělesné hmotnosti myši. Tento rozdíl se zvětšoval v závislosti na dávce. Jak je ale patrné z grafů 24 a 26, aplikace metforminu také vyvolala výrazné snížení příjmu potravy, opět závislé na dávce metforminu, které se pravděpodobně nejvíce podílelo na změnách hmotnosti myši. Příčinou poklesu hmotnosti v 6. a 7. týdnu je provádění GTT a odběrů krve v hladovém a postprandiálním stavu.

Myši s dietou HFD: Při porovnání grafů 24 a 25 je patrné, že průběh nárůstu tělesné hmotnosti myši na dietě HFD kopíruje změny v příjmu potravy. Jak myši s nejvyšší, tak myši s prostřední dávkou metforminu reagovaly na počátek léčby značným snížením příjmu potravy, což se projevilo velmi rychlým poklesem hmotnosti. Po pátém týdnu došlo zřejmě k adaptaci na léčbu a příjem diety se vyrovnal. Od tohoto týdne se také začala stejnoměrně zvyšovat hmotnost všech myši v pokuse. Na konci pokusu byla signifikantně snižena hmotnost myši ze skupin HFD M200 ($p < 0,001$) a HFD M400 ($p < 0,001$).

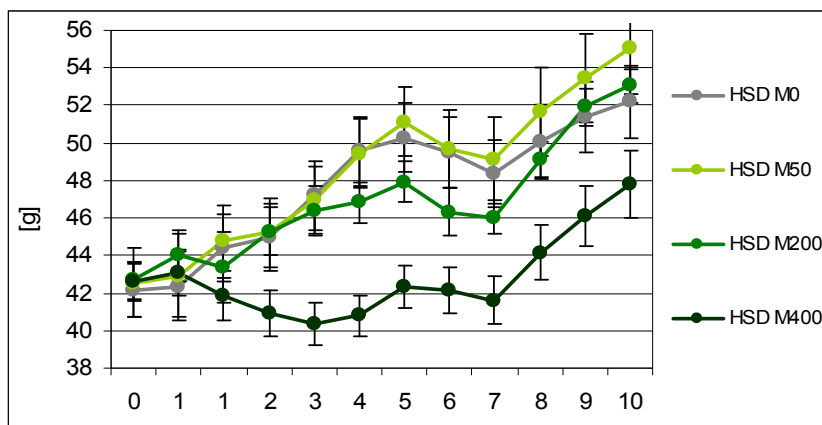


Graf 24.: Průběh změn tělesné hmotnosti u skupin na dietě HFD.

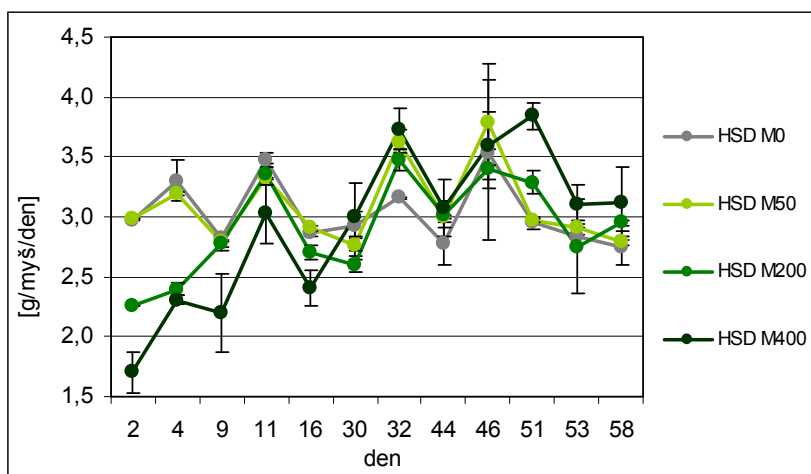


Graf 25.: Spotřeba diety HFD

Myši s dietou HSD: Na rozdíl od diety HFD, příjem diety HSD se u různých dávek metforminu nelišil tak výrazně. I zde byl především v prvních dvou týdnech pokusu pozorován pokles spotřeby diety u myši na nejvyšší dávce metforminu, což se projevilo jako pokles průměrné tělesné váhy v této skupině (graf 26 a 27). Na konci pokusu byl pokles hmotnosti signifikantní pouze u skupiny HSD M400 ($p = 0,005$).



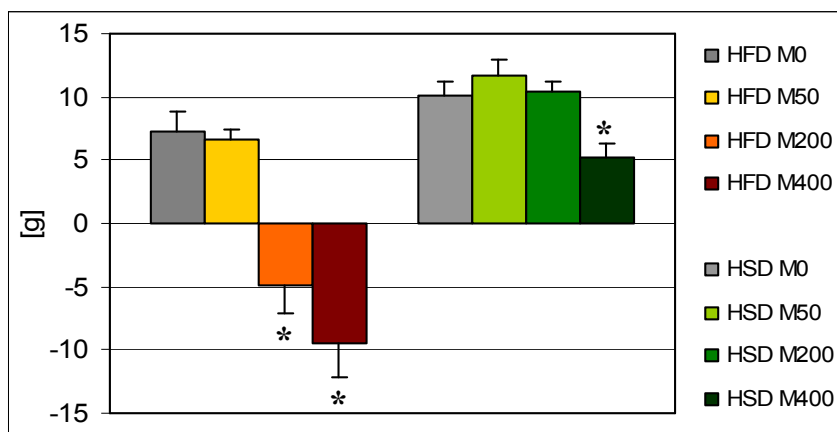
Graf 26 Průběh změn tělesné hmotnosti u skupin na dietě HSD.



Graf 27.: Spotřeba diety HSD

Při porovnání kontrolních skupin HFD M0 a HSD M0 byl pozorován tentýž trend jako v pokuse č.1., nárůst hmotnosti u myši s dietou HSD však nebyl signifikantní ($p = 0,2$). Její spotřeba byla přitom nepatrně vyšší (průměrná spotřeba diety: HFD M0 $2,79 \pm 0,06$ g/den, HSD M0 $3,03 \pm 0,08$ g/den).

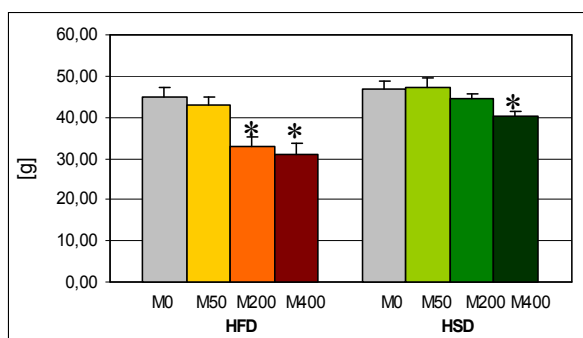
Souhrn: Z těchto dat nelze vyvodit, zda změny v hmotnosti myši souvisely s účinky metforminu na energetický metabolismus, nebo pouze s jeho účinky na příjem potravy. Způsob, jakým nárůst tělesné hmotnosti kopíroval změny v příjmu potravy však naznačuje, že snižování hmotnosti souviselo především s momentálním snížením kalorického příjmu.



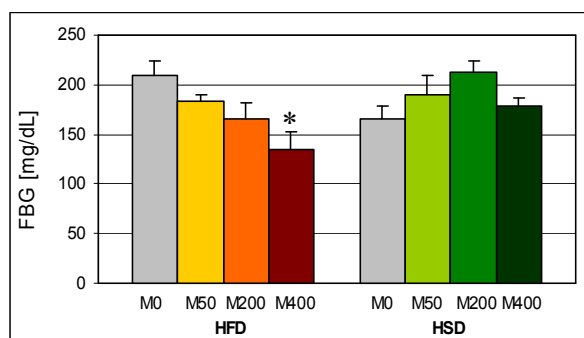
Graf 28.: Váhový přírůstek/úbytek myši od prvního do desátého týdne pokusu

4.2.3 Posouzení míry glukózové tolerance metodou IPGTT

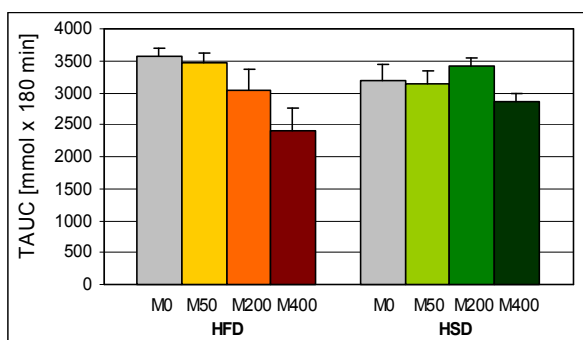
Interpretace výsledků glukózového tolerančního testu byla v tomto případě velice obtížná. Jak ukazuje graf 29, myši vstupovaly do testu již s různou hmotností. Tento fakt se týkal především skupin na dietě HFD, kde vysoké dávky metforminu způsobily značné snížení příjmu potravy a následně také značný pokles hmotnosti. U skupin na dietě HSD nebyl účinek na příjem potravy tak výrazný, proto se od sebe skupiny HSD M0, M50 a M200 signifikantně nelišily. Hmotnost myši ze skupiny HSD M400 byla oproti kontrole snížena signifikantně ($p = 0,016$), nicméně tento rozdíl nebyl tak výrazný jako u skupin HFD M0, M200 a M400 ($M0 \times M200$: $p = 0,001$, $M0 \times M400$: $p < 0,001$).



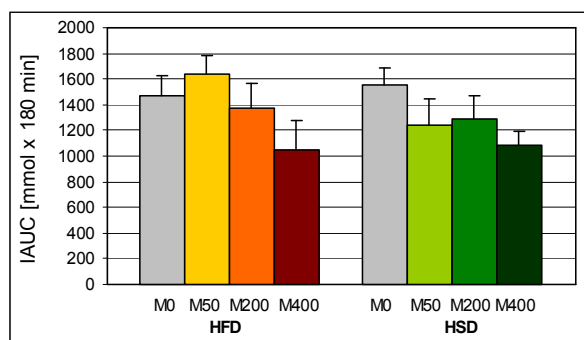
Graf 29.: Hmotnost myši na začátku testu IPGTT



Graf 30.: Bazální hladina glukózy (FBG)

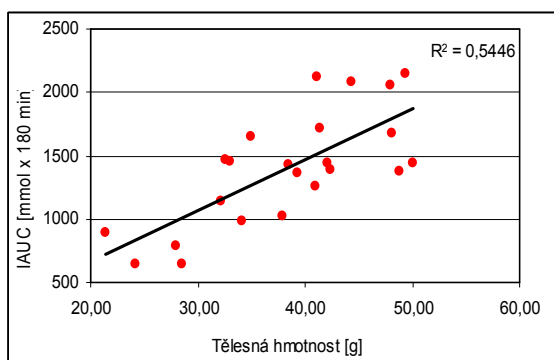


Graf 31.: Celková plocha pod křivkou (T-AUC)

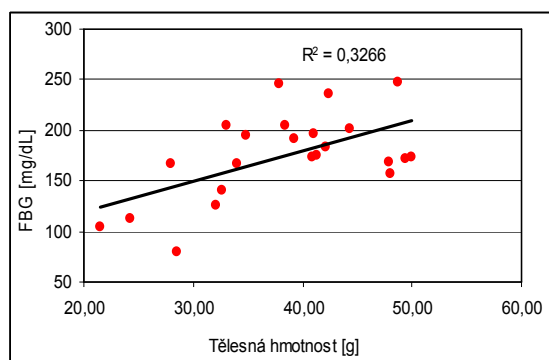


Graf 32.: Inkrementální plocha pod křivkou (I-AUC)

U skupin na dietě HFD jsme pozorovali pokles závislý na dávce metforminu u všech měřených parametrů, tedy u bazální hladiny glykémie (M0 x M400: $p = 0,002$), celkové AUC i inkrementální AUC (graf 30 – 32). Jak ukazují grafy 33 a 34, tyto faktory dobře korelovaly s hmotností myši na začátku testu. Zvláště u bazální hladiny glykémie je korelace s tělesnou hmotností dobře známým faktem, proto nelze říci, jestli pozitivní efekt na glukózovou toleranci vycházel z metabolických účinků metforminu, nebo pouze ze snížení hmotnosti následkem sníženého příjmu potravy.



Graf 33.: Korelace tělesné hmotnosti a bazální hladiny glukózy u skupin na dietě HFD, $R = 0,54$, $p < 0,001$



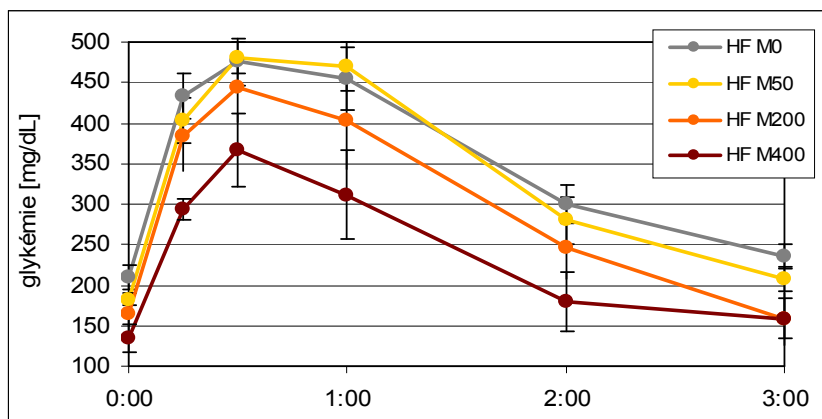
Graf 34.: Korelace tělesné hmotnosti a inkrementální AUC u skupin na dietě HFD, $R = 0,33$, $p = 0,04$

U skupin na dietě HSD nebyl rozdíl v hmotnostech na počátku testu tak výrazný, dalo se proto předpokládat, že případné rozdíly v glukózové toleranci budou spíše indukovány aplikací metforminu. Nebyla zde však odhalena žádná signifikantní závislost hodnot sledovaných parametrů na dávce metforminu. Glukózová tolerance byla částečně zlepšená pouze u skupiny HSD M400. Tento fakt ovšem odpovídal tomu, že se skupina váhově lišila od ostatních.

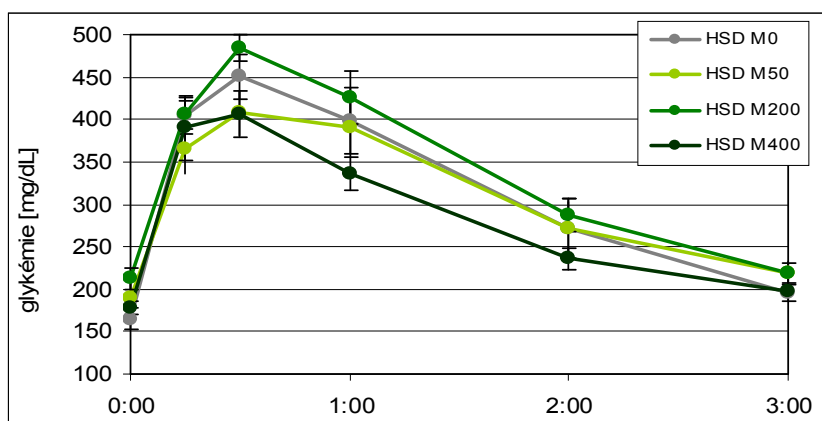
Podobné rozdíly jsme pozorovali na glykemických křivkách (graf 35 a 36). U skupin na dietě HFD bylo patrné zlepšování glukózové tolerance v závislosti na dávce metforminu, respektive v závislosti na hmotnosti myši ve skupině. U skupin HFD M200 a HFD M400 se snižovala jak bazální hladina glykémie, tak plocha pod křivkou. Glykémie také začala po dosažení maximální hodnoty rychleji a strměji klesat, což naznačuje vyšší citlivost k inzulinu, zatímco u kontrolní skupiny a skupiny s nejnižší dávkou metforminu byl patrný opožděný a pomalejší pokles glykémie.

U skupin na dietě HSD tak výrazné rozdíly nebyly, zlepšená glukózová tolerance byla na glykemické křivce patrná pouze u skupiny HSD M400. Glykemické křivky skupin na dietě HSD se však odlišovaly tvarem. Byl zde naznačen rychlejší nástup inzulinové aktivity, který se projevil rychlejším a strmějším poklesem glykémie, a to nejen u skupiny HSD M400, ale také u skupiny HSD M200 a kontrolní HSD M0. Toto pozorování

navazovalo na výsledky IPGTT z pokusu č.1, kde jsme pozorovali u skupin HFD a HSD stejnou míru glukózové tolerance, ačkoli myši ze skupiny HSD byly v době provádění testu výrazně těžší.



Graf 35.: Glykemické křivky skupin na dietě HFD



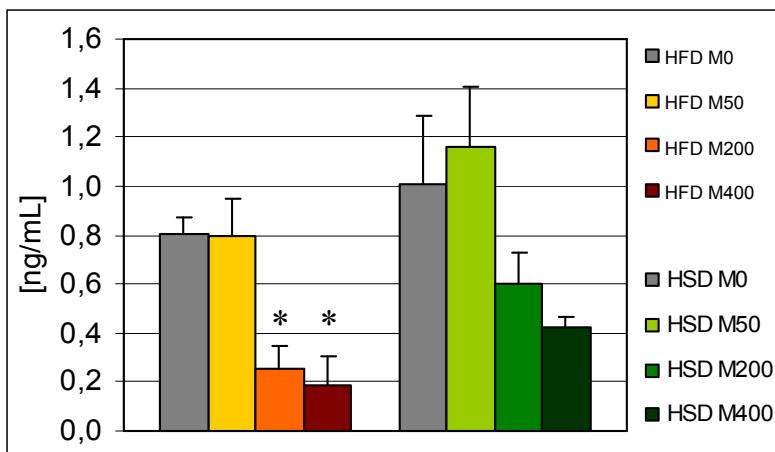
Graf 36.: Glykemické křivky skupin na dietě HSD

Souhrn: V průběhu GTT jsme pozorovali rozdíly mezi skupinami, které odpovídaly rozdílům v dávkách metforminu. Bohužel, všechny tyto rozdíly také velmi dobře korelovaly se změnami v tělesné hmotnosti, proto opět nelze říci, zda byl účinek metforminu na glukózovou homeostázu přímý nebo pouze zprostředkovaný svým účinkem na příjem potravy.

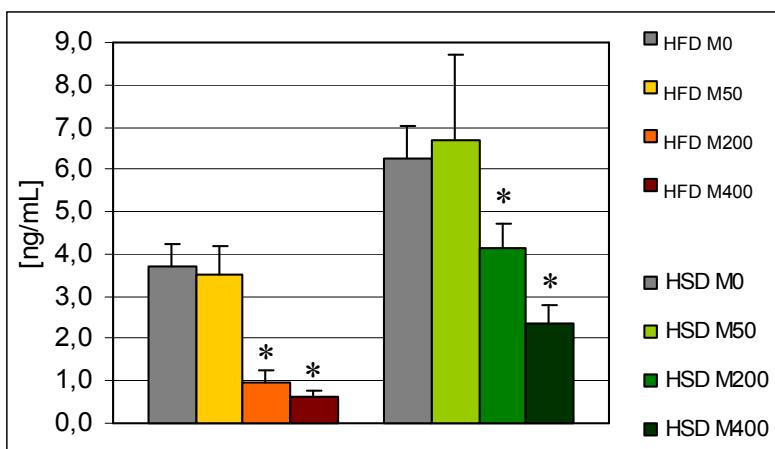
4.2.4 Stanovení obsahu inzulínu v plasmě

Hladinu inzulínu v krvi jsme měřili ve dvou různých dietetických stavech, jednak ve stavu hladovém (graf 39), jednak ve stavu post-absorpčním (graf 40). Krev v hladovém stavu byla odebrána z ocasní žíly v 5. týdnu pokusu. Krev v post-absorpčním stavu byla odebrána v rámci pitvy v 10. týdnu pokusu při podstřižení krční žíly.

U hladiny inzulínu nalačno i v post-absorpčním stavu byl pozorován tentýž trend, tedy že prostřední a nejvyšší dávka metforminu u obou diet výrazně snižovala hladinu

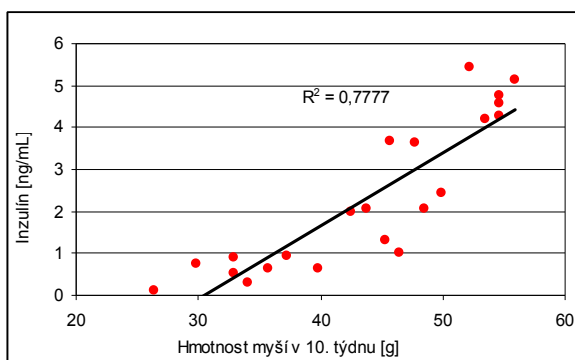


Graf 39.: Hladina inzulinu v krvi nalačno.

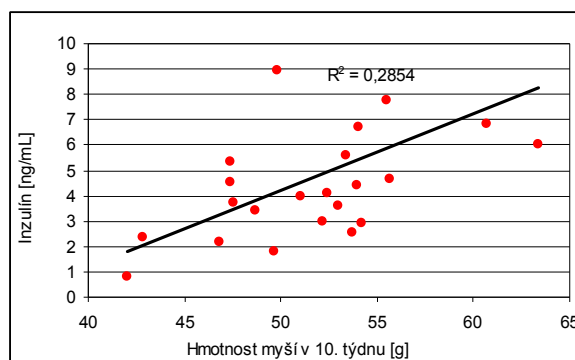


Graf 40.: Hladina inzulinu v krvi v post-absorpčním stavu.

inzulinu v plasmě. V případě myši na dietě HFD toto snížení korelovalo se snížením průměrné hmotnosti myši v důsledku nižšího příjmu potravy (graf 37). U skupiny HSD byl však účinek metforminu na průměrné hmotnosti myši ve skupinách nezávislý (graf 38). Hladina inzulinu byla u myši na dietě HSD celkově vyšší než v případě diety HFD. Rozdíly mezi skupinami ani jednotlivými dávkami metforminu většinou nebyly signifikantní pravděpodobně z důvodu nízkého počtu myši ve skupině. Ve stavu nalačno



Graf 37.: Korelace hladiny inzulinu v post-absorpčním stavu s hmotností myši na dietě HFD ($R = 0,777$, $p < 0,001$).



Graf 38.: Korelace hladiny inzulinu v post-absorpčním stavu s hmotností myši na dietě HSD ($R = 0,285$).

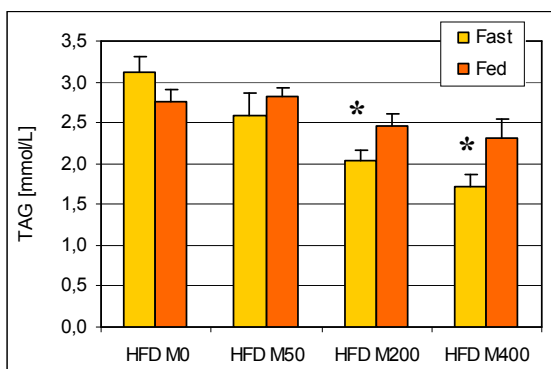
po pěti týdnech podávání experimentálních diet a metforminu se hladiny inzulinu významně odlišovaly pouze u skupin HFD M200 a M400. Po 10 týdnech trvání pokusu při měření v post-absorpčním stavu byla hladina inzulinu odlišená již u všech skupin s prostřední a nejvyšší dávkou metforminu (HFD M0 x M200, HFD M0 x M400: $p < 0,001$, HSD M0 x M200: $p = 0,03$, HSD M0 x M400: $p < 0,001$). Hladina inzulinu kontrolních skupin HFD M0 a HSD M0 se také lišila ($p = 0,023$), což odpovídalo výsledkům z pokusu č. 1.

Souhrn: Hladina inzulinu v krvi v obou dietetických stavech klesala se zvyšující se dávkou metforminu na pozadí diety HSD i HFD. Zatímco u diety HFD tento trend velmi dobře koreloval s tělesnou hmotností myši, na pozadí diety HSD se tento účinek zdál být na hmotnosti nezávislý a mohlo by se tudíž jednat o přímý účinek metforminu na metabolismus.

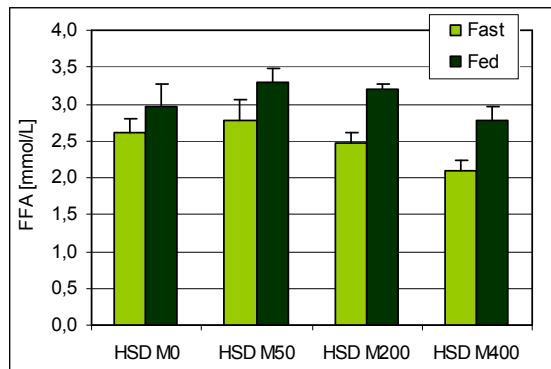
4.2.5 Porovnání obsahu lipidových metabolitů v odlišných nutričních stavech

Obsah lipidových metabolitů v plasmě byl měřen po pěti týdnech podávání experimentálních diet a metforminu v rámci odběrů krve v hladovém a postprandiálním stavu. Hladina metabolitů ve stavu hladovém vypovídala více o metabolickém stavu organismu, zatímco v postprandiálním stavu bylo nutné počítat s možným přímým účinkem rozdílného složení diet. Jak již bylo zmíněno, vysoké dávky metforminu způsobily pokles v příjmu potravy a následné snížení hmotnosti myši v příslušných skupinách. Právě v 5. týdnu, na jehož konci byly prováděny tyto odběry, však došlo k adaptaci na léčbu a skokovému vyrovnání příjmu potravy u všech skupin. Při vyhodnocování následujících výsledků bylo proto nutné brát v úvahu rozdílné hmotnosti myši v závislosti na dávce metforminu, avšak rozdílem v příjmu potravy by již výsledky neměly být ovlivněny.

Vliv na hladinu cholesterolu: Dávka metforminu významně neovlivnila obsah cholesterolu v krvi myši ze skupin na dietě HSD (graf 42). U myši na dietě HFD jsme pozorovali pokles v obsahu cholesterolu v závislosti na dávce metforminu (graf 41). Tento rozdíl byl statisticky významný v hladovém stavu, ve stavu postprandiálním byl naznačen pouze obdobný trend.

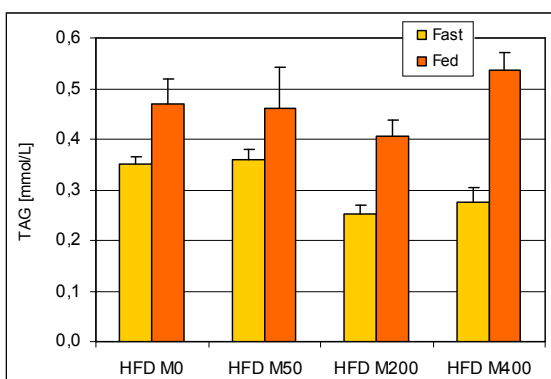


Graf 41.: Obsah CHOL v plasmě myši na dietě HFD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)

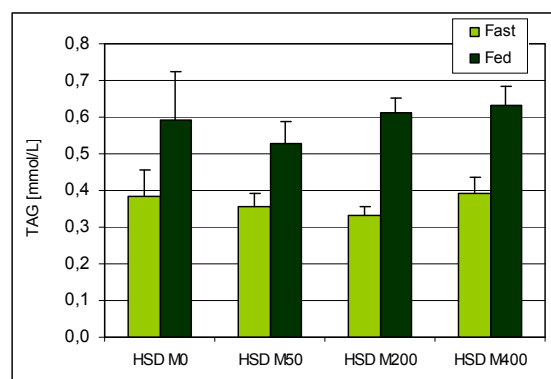


Graf 42.: Obsah CHOL v plasmě myši na dietě HSD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)

Vliv na hladinu TAG: TAG v krvi jsou obsaženy především v chilomikronech a VLDL částicích. V souladu s tímto faktem jsme u obou diet pozorovali nárůst obsahu TAG v postprandiálním stavu oproti stavu hladovému. Dieta HSD indukovala poněkud vyšší nárůst obsahu TAG než dieta HFD. Efekt metforminu však překvapivě na pozadí žádné z diet patrný nebyl (graf 43 a 44).

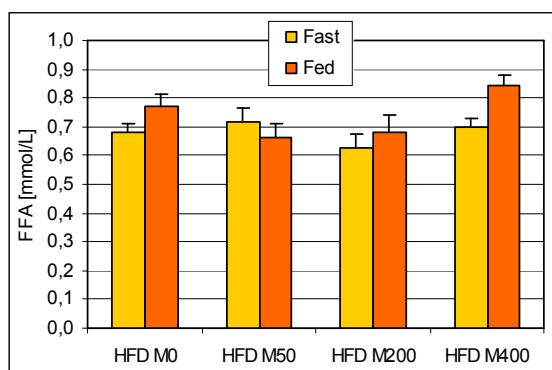


Graf 43.: Obsah TAG v plasmě myši na dietě HFD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)

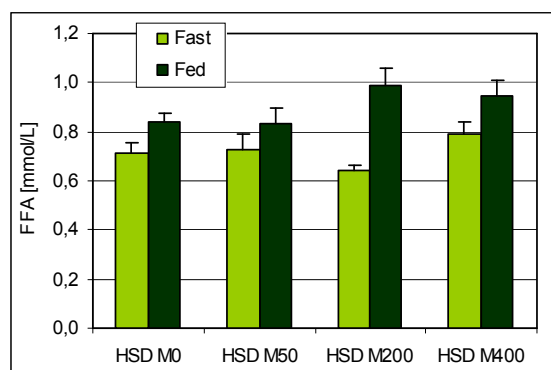


Graf 44.: Obsah TAG v plasmě myši na dietě HSD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)

Vliv na hladinu FFA: Obsah volných mastných kyselin by měl být ve zdravém organismu v postprandiálním stavu relativně nízký. Vyšší hladiny jsou charakteristické pro stav hladovění. Jak ukazují grafy 45 a 46, hladiny FFA byly ve stavu nalačno v některých případech dokonce nižší než ve stavu postprandiálním. Tento fakt by mohl svědčit o vysoké míře inzulinové rezistence, jejíž charakteristikou je právě trvale zvýšená hladina volných mastných kyselin v krvi. Ani v tomto případě však neměla dávka metforminu na hladinu FFA žádný vliv.



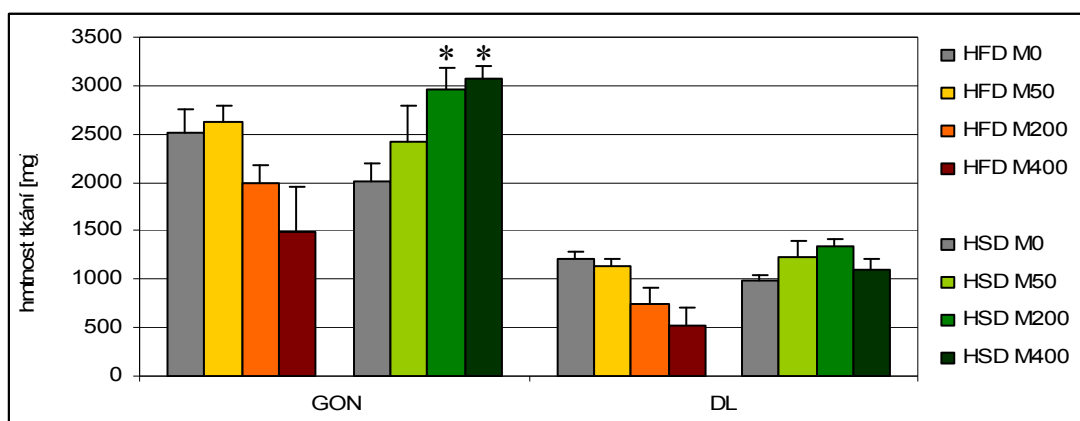
Graf 45.: Obsah FFA v plasmě myši na dietě HFD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)



Graf 46.: Obsah FFA v plasmě myši na dietě HSD v postprandiálním stavu (FED) a ve stavu nalačno (FAST)

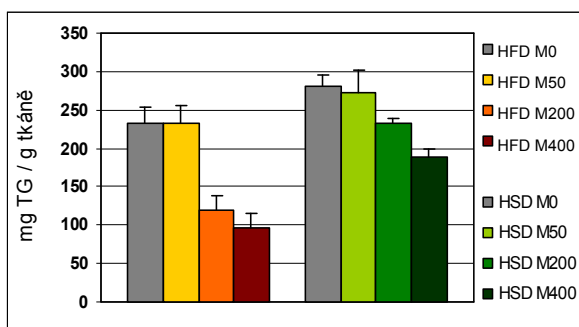
4.2.6 Analýza tkání

Graf 47 ukazuje hmotnosti dvou tukových dep, depa gonadálního a dorso-lumbálního. Na pozadí diety HFD se hmotnost těchto dep snižovala v závislosti na dávce metforminu, což odpovídalo také rozdílům v hmotnostech myši. U diety HSD však hmotnost gonadálního ani dorso-lumbálního depa s hmotností myši v jednotlivých skupinách ani s dávkou metforminu nekorelovala. Naopak prostřední a nejvyšší dávka metforminu indukovala signifikantní nárůst hmotnosti gonadálního tukového depa vůči kontrolní skupině (M0 x M200: $p = 0,006$, M0 x M400: $p = 0,003$). Při porovnání kontrolních skupin HFD M0 a HSD M0 byla hmotnost obou tukových dep vyšší u myši na dietě HFD a to i přes to, že myši na dietě HSD vážily v průměru více (GON: nesignifikantní, DL: $p = 0,029$). Tento výsledek se neshodoval s výsledky z pokusu č.1, kde dieta HSD indukovala vyšší míru akumulace tuku ve všech tukových depech. Měřili jsme také hmotnost hnědé tukové tkáně (graf 49). Rozdíly mezi skupinami odpovídaly rozdílům v průměrných hmotnostech myši. Stejně jako v pokusu č.1 indukovala dieta HSD u kontrolní skupiny větší nárůst BAT než dieta HFD, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,1$).

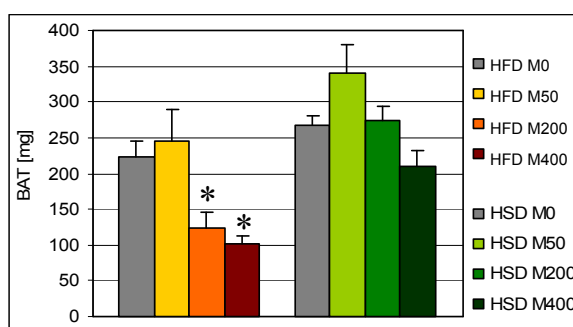


Graf 47.: Hmotnost gonadálního (GON) a dorso-lumbálního (DL) tukového depa.

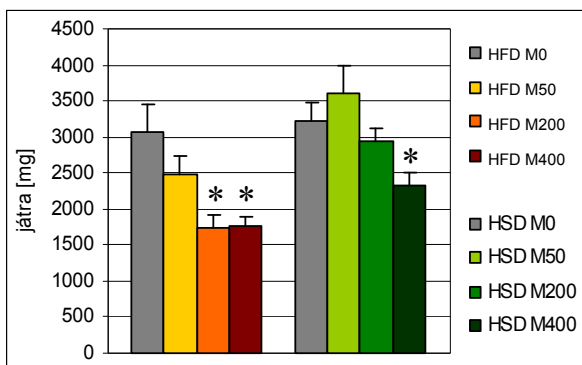
Hmotnost jater se mezi skupinami signifikantně lišila (graf 50). Abychom odmaskovali případný účinek, který by byl nezávislý na celkové hmotnosti organismu, vztáhli jsme hmotnost jater na celkovou hmotnost myši (Graf 51). U diety HFD se tímto rozdíly mezi skupinami zcela smazaly, na pozadí diety HSD však účinek prostřední a nejvyšší dávky metforminu zůstal zachován (M0 x M200: $p = 0,2$, M0 x M400: $p = 0,026$). Rozdílům v hmotnostech jater odpovídaly také rozdíly v obsahu TAG v jaterní tkáni (graf 48).



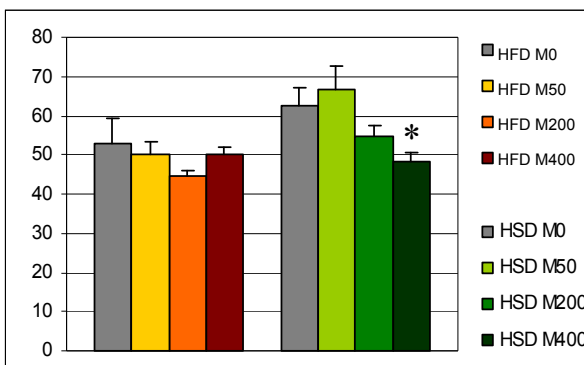
Graf 48.: Obsah triacylglycerolu (TAG) v jaterní tkáni



Graf 49. Hmotnost hnědé tukové tkáně (BAT)



Graf 50.: Hmotnost jater

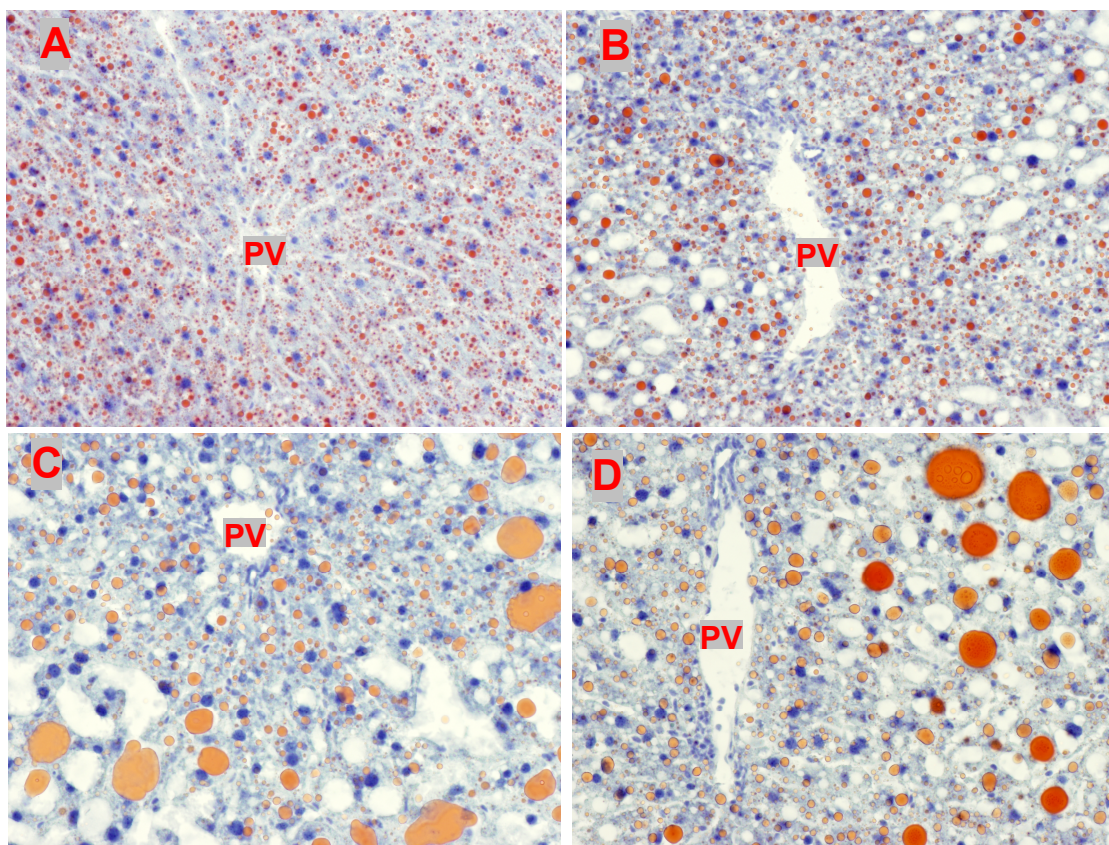


Graf 51.: Hmotnost jater vztažená na hmotnost myši

Z vybraných vzorků jater byly také připraveny kryorezy pro histochemické barvení neutrálních lipidů olejovou červení (Oil-Red-O). Jedná se o lysochrom, tedy barvivo rozpustné pouze v tucích, které červeně obarví TAG a ostatní lipidy ve tkáních. Všechny snímky jsou pořízeny při zvětšení 20x.

Obr 21. ukazuje řezy jaterní tkáně myši ze skupin HFD M0 (A), HFD M400 (B), HSD M0 (C) a HSD M400 (D). Nejmenší množství tuků a také nejmenší poškození jaterní tkáně jsme pozorovali u skupiny HF M400 (B), kde došlo v průběhu pokusu ke značnému snížení hmotnosti myši. Více tuku a větší tukové kapénky jsme pozorovali u skupiny HF M0 (A). U skupin HSD M0 a M400 bylo pak v jaterní tkáni takové množství ektopického tuku, že se jinak miniaturní tukové kapénky (viz obr. B) slévaly při řezání vytékaly do mezibuněčných prostor. Prázdné buňky, ve kterých se původně nacházely tukové kapénky, lze na obrázcích C, D a v menší míře také na obrázku A pozorovat jako prázdná bílá místa.

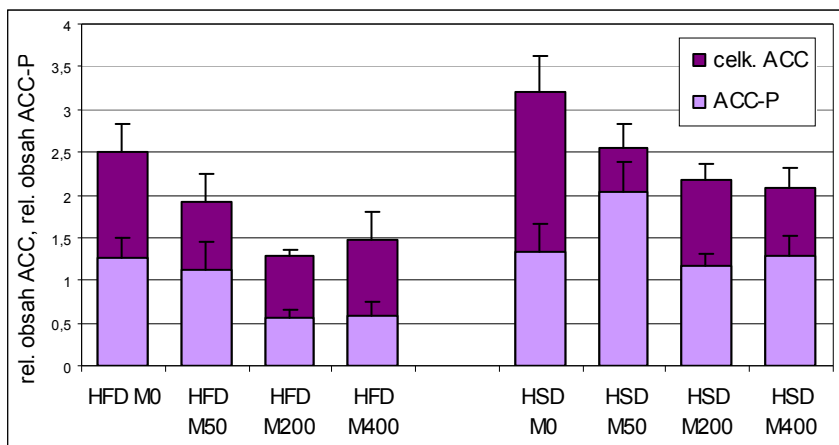
Výsledky histochemického barvení odpovídaly výsledkům biochemického stanovení obsahu TAG v jaterní tkáni (graf 48) a makroskopickému vzhledu, který odpovídal rozvinuté jaterní steatóze především u myši na dietě HSD.



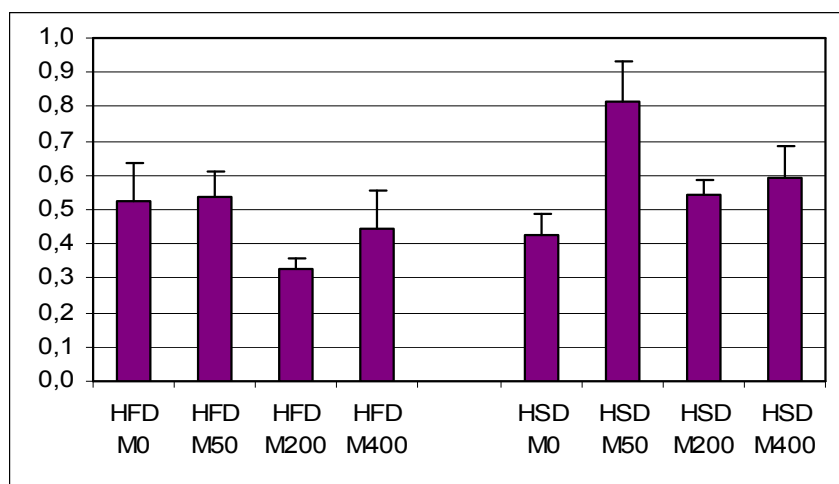
Obr. 21.: Kryorezy jaterní tkáni s histochemickým barvením Oil-Red-O pro detekci lipidů ve tkáni.
(A) HFD M0, (B) HFD M400, (C) HSD M0, (D) HSD M400
PV – portální vena, zvětšeno 20x

4.2.7 Stanovení aktivity AMPK v jaterní tkáni

Aktivitu AMPK jsme měřili nepřímým stanovením míry fosforylace enzymu ACC. Čím vyšší je míra fosforylace ACC, vyjádřená jako poměr fosforylované a defosforylované formy ACC ($ACC-P / ACC$), tím vyšší by měla být aktivita AMPK. Jak ukazují grafy 52 a 53, nebyly pozorovány žádné změny v aktivitě ACC v závislosti na dávce metforminu. U skupin na dietě HSD byl patrný vyšší celkový obsah ACC i nepatrně zvýšený obsah její fosforylované formy. U diety HFD a do jisté míry i diety HSD odpovídal celkový obsah ACC i obsah její fosforylované formy průměrným hmotnostem myši ve skupinách.



Graf 52.: Relativní obsah fosforylované a defosforylované formy ACC v jaterní tkáni myši na dietách HFD a HSD



Graf 53.: Poměr fosforylované a defosforylované formy ACC v jaterní tkáni myši na dietách HFD a HSD. (Nepřímo vyjadřuje aktivitu AMPK)

5 Diskuse

Složení experimentálních diet

Cílem této práce bylo porovnat v pokuse č. 1 účinky dvou obezitogenních vysokotukových diet HFD a HSD u myší, které by se mohly lišit účinkem na rozvoj metabolických poruch, jako je inzulínová rezistence, jaterní steatóza, dyslipidémie a další. V původním modelu, zavedeném v naší laboratoři, byla využívána vysokotuková dieta HFD, jejíž hlavní složku tvoří n-6 nenasycené mastné kyseliny obsažené v kukuřičném oleji a dále složité cukry v podobě škrobu. V nově testované dietě HSD byla tuková složka tvořena především vepřovým sádlem, které obsahuje nasycené mastné kyseliny (k. palmitovou 16:0 a k. stearovou 18:0) a mononenasycenou kyselinou olejovou (18:1 n=9). Cukerná složka byla tvořena jednoduchým cukrem sacharózou. Sacharóza na rozdíl od škrobu obsahuje kromě glukózy také fruktózu, která je v literatuře ve spojitosti s rozvojem IR často zmiňována (viz dále).

Složení nové experimentální diety HSD jsme zvolili z několika následujících důvodů. V literatuře se uvádí, že by nasycené mastné kyseliny měly mít ve srovnání s nenasycenými mastnými kyselinami silnější lipogenní účinek^{166,167}. Tento účinek by měl být zprostředkován stimulačním vlivem nasycených mastných kyselin na expresi genu pro SREBP1c (sterol regulatory binding protein 1c), což je transkripční faktor, který stimuluje expresi prakticky všech genů kódujících lipogenní enzymy včetně SCD (steroyl-CoA dehydrogenáza), ACC, FAS a dalších¹⁶⁸. Klíčový pro zprostředkování účinků nasycených mastných kyselin je enzym SCD, jehož aktivita určuje míru jaterní lipogeneze. Katalyzuje tvorbu dvojné vazby mezi uhlíky na 9 a 10 pozici řetězce mastných kyselin a podílí se tak na konverzi kyseliny palmitové (16:0) na palmitooleát (16:1) a kyseliny stearové (18:0) na oleát (18:1). Kyselina olejová, která vzniká desaturací kyseliny stearové, je klíčovým regulátorem dráhy vedoucí k expresi SREBP1c. Zvýšený obsah nasycených mastných kyselin v potravě tak vede ke zvýšené tvorbě oleátu a ke zvýšené expresi lipogenních enzymů a stimulaci jaterní lipogeneze¹⁶⁷.

Mononenasycená kyselina olejová, která je v poměrně vysoké míře zastoupena v dietě HFD, a ještě více pak v dietě HSD, představuje nejvíce preferovaný substrát pro esterifikaci na cholesterol nebo glycerol s následnou tvorbou TAG. Vysoký podíl kyseliny olejové v potravě tedy sám o sobě znamená vyšší míru syntézy TAG a ukládání tělesného tuku¹⁶⁷.

Délka mastných kyselin a míra jejich saturace také značně ovlivňuje rychlost jejich oxidace. Jak ukázaly pokusy na laboratorních hlodavcích i lidech, rychlost oxidace mastných kyselin klesá s narůstající délkou uhlíkového řetězce a naopak roste s rostoucím počtem dvojných vazeb^{169,170}. Dlouhé nenasycené mastné kyseliny, jako například stearát

(18:0), by mohly mít tendenci se v buňkách hromadit a podílet se tak větší mírou na lipotoxickém účinku FFA a ukládání ektopického tuku.

Úloha fruktózy v potravě zůstává nadále kontroverzní. Značné množství studií především na zdravých lidech ukázalo, že fruktóza přímo nezvyšuje glykémii, naopak ji může i mírně snížit, a na rozdíl od glukózy se přímo nepodílí na rozvoji inzulínové rezistence¹⁷¹. Jiné studie však ukázaly, že především u jedinců s poškozenou glukózovou homeostázou, způsobuje fruktóza dyslipidémii spojenou se zvýšenou hladinou LDL a TAG a sníženou hladinou HDL v krvi a druhotně také zhoršení inzulínové rezistence¹⁷². Dieta se zvýšeným obsahem fruktózy se často využívá k indukci inzulínové rezistence u hlodavců¹⁷¹.

Fruktóza je metabolizována v játrech, kde se ve své fosforylované formě zapojuje do stejných reakcí, kterými je metabolizována glukóza. Metabolismus fruktózy je ale mnohem rychlejší, což vede k rychlému nasycení buňky redukovanými formami koenzymů NADH a NADPH. Díky tomu se metabolity vznikající přeměnou fruktózy častěji využívají v metabolické dráze glukoneogeneze a syntézy glykogenu, nebo v *de novo* syntéze volných mastných kyselin¹⁷¹. Po podání fruktózy také dochází ke stimulaci exprese genu pro SCD¹⁷³. Fruktóza je podobně jako nasycené mastné kyseliny lipogenním substrátem, který by měl zvyšovat hladinu TAG v krvi, na rozdíl od FFA ale především v postprandiálním stavu.

Lipogenní účinky diety HSD

V souladu s výše uvedenými fakty jsme v pokuse č.1 v důsledku 8-týdenního podávání diety pozorovali vyšší míru poškození jater u skupiny HSD než u skupiny HFD. Toto poškození se projevilo vyšší hmotností jater a to i po vztahování hmotnosti jater na tělesnou váhu, dále vyšším obsahem TAG ve tkáni i viditelnými makroskopickými změnami ve struktuře jater. Tyto výsledky se potvrdily i v pokuse č.2, kde jsme tentýž efekt pozorovali při srovnání kontrolních skupin také na histologických řezech. Také hmotnost tukových dep byla u skupiny HSD vyšší než u skupiny HFD. Tento jev by mohl být částečně způsoben vyšší mírou jaterní lipogeneze, nicméně vliv mohl mít u skupiny HSD také mírně zvýšený příjem potravy. Vyšší hmotnost tukových dep nebyla u myši ze skupiny HSD v pokuse č.2 pozorována.

Konzumace diety HSD vyvolává vyšší nárůst hmotnosti

Ačkoliv byl na konci pokusu u myši ze skupiny HSD naměřen signifikantně vyšší nárůst tělesné hmotnosti, vliv složení vysokotukové diety na váhový přírůstek nelze jednoznačně interpretovat. Je nutné konstatovat, že spotřeba potravy byla u myši ze skupiny HSD po celou dobu pokusu nepatrně vyšší, což mohlo výsledné rozdíly v tělesné hmotnosti značně ovlivnit. Stejná tendence pak byla pozorována i v pokuse č.2. Rozdíl ve spotřebě diety HFD a HSD mohl být způsoben rozdíly v kompozici a kvalitě diet

(dieta HFD byla podávána v pastovité formě, zatímco dieta HSD ve formě pelet). Dieta HSD také obsahovala značné množství sacharózy, a proto je možné, že zvýšený příjem potravy způsobila preference sladké chuti, která je pro svou výhodnost z evolučního hlediska geneticky kódována u většiny organismů. Některé práce navíc uvádějí, že myši kmene C57BL/6 preferují sladkou chuť více než jiné myší kmeny ¹⁷⁴.

Konzumace diety HSD indukuje silnější rozvoj inzulinové rezistence

Ve shodě s literaturou ¹⁷⁵ se následkem indukce obezity podáváním vysokotukových diet rozvinula u všech myší inzulinová rezistence. U obou skupin jsme naměřili vysokou hladinu glykémie ve stavu nalačno, což značí zvýšenou míru jaterní glukoneogeneze a přítomnost jaterní inzulinové rezistence. Hladina inzulinu nalačno byla nejspíše následkem kompenzace inzulinové rezistence také zvýšená. Tento nárůst byl signifikantně vyšší u skupiny HSD, což naznačuje, že dieta HSD indukuje vyšší míru inzulinové rezistence než dieta HFD. To potvrdil i výpočet HOMA-IR indexu, pomocí kterého lze míru inzulinové rezistence kvantifikovat.

Existuje řada důvodů, proč byly myši ze skupiny HSD více rezistentní vůči inzulinu. Za jednu z hlavních příčin rozvoje inzulinové rezistence se v literatuře označuje vysoká hladina FFA v krvi. Po osmi týdnech podávání experimentálních diet jsme naměřili vysokou hladinu FFA v plasmě u obou skupin, nicméně vyšší byla paradoxně u skupiny HFD, ačkoliv tento rozdíl nebyl statisticky významný. Snížení obsahu FFA v plasmě u skupiny HSD bylo pravděpodobně dáno vyšší mírou jaterní lipogeneze, což způsobilo ukládání mastných kyselin ve formě TAG do tukových dep včetně hnědé tukové tkáně a do jater. Podle mnoha současných prací sice množství ektopického tuku s mírou inzulinové rezistence koreluje, nicméně ukládání tuku ve formě TAG mimo tuková depa pravděpodobně inzulinovou rezistenci nezpůsobuje ani nezhoršuje ¹¹⁸. Tento jev může mít naopak protektivní účinek, který spočívá právě v pufování plasmatické hladiny FFA ^{119,121,122}. Silnější rozvoj inzulinové rezistence u skupiny HSD tedy pravděpodobně nebyl zprostředkován pouze lipotoxickým účinkem volných mastných kyselin.

Dalšími příčinami rozvoje inzulinové rezistence může být přítomnost zánětu v tukové tkáni a zvýšená hladina toxického ceramidu. Obě tyto možnosti jsou v našem případě relevantní. Přímým prekurzorem syntézy ceramidu je kyselina palmitová ^{56,57}, která představuje 25 % mastných kyselin diety HSD, zatímco v dietě HFD je to pouze 10 %. Co se týče zánětu, bylo prokázáno, že nasycené mastné kyseliny přímo aktivují prozánětlivé receptory TLR4 na membránách adipocytů, zatímco nenasycené mastné kyseliny mohou mít účinek opačný ^{80,81}. Zánětlivé cytokiny, které se v průběhu zánětu uvolňují do krevního oběhu pak velmi silně stimulují rozvoj inzulinové rezistence ⁷¹. Pro potvrzení této domněnky by bylo vhodné stanovit míru exprese různých prozánětlivých cytokinů v tukové tkáni.

Ačkoliv myši ze skupiny HSD vykazovaly známky vyšší rezistence vůči působení inzulínu, během glukózového tolerančního testu se ukázalo, že mají paradoxně lepší glukózovou toleranci, neboli lepší schopnost odstranit glukózu z krve po administraci stanovené dávky glukózy na počátku testu. Tento jev lze vysvětlit tak, že dieta HSD indukuje kromě rozvoje inzulínové rezistence také silnější sekreci inzulínu z pankreatu. Je známo, že mastné kyseliny se podílejí na glukózou stimulované sekreci inzulínu, a že důležitou roli zde mohou sehrát jak mastné kyseliny syntetizované v pankreatu *de novo*, tak FFA z potravy, které se do pankreatu dostanou z krevního oběhu⁴⁵. Sein a spol. v roce 1997 navíc ukázali, že dlouhé a nasycené mastné kyseliny mají na sekreci inzulínu silnější účinek, než kyseliny nenasycené.

Souhrn

V souhrnu lze říci, že ve srovnání s původní dietou HFD projevují myši tendenci konzumovat větší množství diety HSD. Tento rozdíl by mohl vést k vyššímu nárůstu tělesné hmotnosti. Konzumace diety HSD indukuje vyšší míru inzulínové rezistence a ukládání ektopického tuku. Tyto výsledky se shodují s všeobecnou představou, že nasycené mastné kyseliny představují pro organismus větší metabolickou zátěž než kyseliny nenasycené. Vlivem podávání diety HSD dochází pravděpodobně k silné stimulaci jaterní lipogeneze, což jsme zatím prokázali pouze nepřímo analýzou obsahu lipidových metabolitů v plasmě a ve tkáni. K potvrzení této hypotézy by bylo potřeba kvantifikovat míru exprese genů pro lipogenní enzymy.

Administrace metforminu při dlouhodobém pokusu

Dalším cílem práce bylo zavést metodu, při které by bylo možné podávat obézním myším metformin v rámci dlouhodobého pokusu. Takový model by nejlépe odpovídal způsobu podávání metforminu u lidí a umožňoval by výzkum účinků kombinovaného podávání metforminu s dalšími látkami, například s n-3 PUFA. V současné době není v literatuře takový model běžně popisován. Nejčastěji je metformin podáván jednorázově injekčně nebo gaváží maximálně po dobu několika dnů. Takový způsob aplikace sice zaručuje možnost přesného dávkování, není však vhodný pro dlouhodobé pokusy z důvodu stresové zátěže laboratorních zvířat.

Stejně jako například Rouru, Ma, nebo Anisimov jsme zvolili podávání metforminu rozpuštěného v pitné vodě¹⁷⁶⁻¹⁷⁸. Metformin jsme podávali obézním myším, u kterých byl rozvoj obezity a s ní spojených metabolických poruch vyvolán dvouměsíčním podáváním vysokotukové diety HFD.

Přítomnost metforminu ve vodě okamžitě způsobila velmi silný pokles příjmu potravy a s ním spojený váhový úbytek závislý na dávce metforminu. V literatuře je často popisován anorexigenní efekt metforminu¹⁷⁶, spojený podle nedávné studie Auberta a spol. s centrální senzitivací organismu k působení anorexigenního hormonu leptinu¹⁷⁹.

Příčinou razantního snížení příjmu potravy (u skupiny HFD M400 až o 70 %) mohlo být také nechutenství, jeden z popsaných vedlejších účinků metforminu. Tomu by odpovídal i fakt, že se po pěti týdnech léčby metforminem příjem potravy u všech skupin vyrovnal. Zajímavé je, že supresivní účinek na příjem potravy byl mnohem menší u myši ze skupiny HSD. Zatímco u skupiny HFD snižovala nejvyšší dávka metforminu po dvou týdnech léčby spotřebu potravy o 60 %, u skupiny HSD byl v té době příjem potravy mezi kontrolní skupinou a skupinou HSD M400 vyrovnaný. Tento jev zatím nedokážeme vysvětlit. Je možné, že, stejně jako v předchozím pokuse, hrála roli kvalita diety, nebo sladká příchut' diety HSD daná přítomností sacharózy.

Účinky metforminu na glukózovou homeostázu

Podle literatury metformin brání rozvoji inzulínové rezistence především tak, že snižuje intenzitu jaterní glukoneogeneze, která je u inzulínorezistentních pacientů a diabetiků zvýšená a výrazně tak přispívá k udržování trvalé hyperglykémie^{127,160}. O intenzitě syntézy glukózy *de novo* vypovídá do značné míry hladina glykémie v lačném stavu. Snížení hodnoty glykémie nalačno odpovídající dávce metforminu jsme však pozorovali pouze u skupiny HFD, kde se již v době měření vyskytovaly značné rozdíly v tělesné hmotnosti způsobené snížením příjmu potravy po podání metforminu. U skupiny HSD, kde se mezi sebou myši s různými dávkami metforminu tak výrazně hmotnostně nelišily, jsme pokles glykémie nalačno nepozorovali. Naopak všechny myši ze skupiny HSD, nezávisle na dávce metforminu, měly hladinu glukózy velmi vysokou (> 170 mg/dL), což naznačuje silně rozvinutou inzulínovou rezistenci. To by znamenalo, že rozdíly v glykémii naměřené u myši na dietě HFD jsou nejspíše způsobené váhovými rozdíly mezi jednotlivými skupinami myši.

Jedinou změnou v závislosti na dávce metforminu, která přímo nekorelovala s hmotnostmi myši, byl pokles hladiny inzulínu nalačno a v postprandiálním stavu. Tento pokles jsme naměřili nejen u skupiny HFD, kde koreloval jak s dávkou metforminu, tak s hmotnostmi myši, ale také u skupiny HSD, kde odpovídal pouze dávce metforminu. Protože se jaterní inzulínová rezistence v závislosti na dávce metforminu nesnižovala (glykémie nalačno nebyla ovlivněna dávkou metforminu), lze z toho vyvodit, že metformin zvýšil citlivost k inzulínu na periférii, tedy na úrovni svalových buněk a adipocytů. Tento výsledek odpovídá popsaným stimulačním účinkům metforminu na exocytózu váčků s glukózovými přenašeči GLUT4, který vede k navýšení vstupu glukózy do buněk bez další potřeby sekrece inzulínu^{152,156}.

Účinky metforminu na metabolismus lipidů

Jedním z nejlépe popsaných účinků metforminu je inhibice klíčového lipogenního enzymu ACC^{158,159} a následné snižování míry jaterní lipogeneze, které je zároveň doprovázeno nárůstem β -oxidace mastných kyselin¹⁶². V souladu s těmito fakty jsme

pozorovali u skupiny HFD i HSD pokles obsahu TAG v játrech v závislosti na dávce metforminu. U skupiny HSD tyto rozdíly sice nebyly signifikantní, nicméně trend odpovídal velikosti dávky metforminu a neshodoval se zcela s rozdíly v tělesné hmotnosti.

Analýzou hmotnosti jater vztažené na celkovou tělesnou hmotnost jsme odhalili rozdíly odpovídající dávce metforminu pouze u skupiny HSD, zatímco u skupiny HFD rozdíly v hmotnostech jater po vztažení na tělesnou hmotnost zcela vymizely. Důvodem tohoto jevu by mohl být výrazný lipogenní účinek diety HSD. Protože játra myši ze skupiny HSD byla metabolicky mnohem více zatížená, účinek metforminu se zde mohl snáze projevit.

Při stanovení obsahu lipidových metabolitů v plasmě v různých dietetických stavech jsme nepozorovali žádné rozdíly v závislosti na dávce metforminu, ačkoliv by měl metformin hladinu volných mastných kyselin, TAG i cholesterolu v krvi snižovat¹²⁷. Žádoucí účinek byl naznačen pouze u skupiny HFD v případě hladiny cholesterolu v lačném stavu. Dieta HSD indukovala poněkud vyšší nárůst hladiny TAG v postprandiálním stavu, což odpovídá popsáním účinkům fruktózy obsažené v potravě¹⁷¹. Ani u jedné z diet jsme pak nepozorovali nárůst hladiny FFA v lačném stavu oproti stavu postprandiálnímu, což by mohlo svědčit o přítomnosti inzulinové rezistence, která se mimo jiné vyznačuje trvale zvýšenou hladinou FFA v krvi.

Účinek metforminu na aktivitu AMPK

Většina publikací uvádí, že značná část účinků metforminu je zprostředkována aktivací AMPK^{135,136}. Zvýšená aktivita AMPK se projeví zvýšenou koncentrací fosforylované formy této kinázy, nebo zvýšenou fosforylací některého z jejích přímých substrátů (například ACC). Tento jev byl po administraci metforminu opakovaně pozorován v rámci nejrozumnějších studií^{135,140,153}. Přesto v této studii nebyly při nepřímém stanovení aktivity AMPK prostřednictvím stanovení míry fosforylace ACC zjištěny žádné rozdíly odpovídající dávkám metforminu.

Tento výsledek spolu s výsledky glukózového tolerančního testu a se stanovením lipidových metabolitů v plasmě, naznačuje, že účinek metforminu nebyl dostatečný. Byly pozorovány změny, při kterých se slabý účinek metforminu akumuloval po delší dobu, což byl například jeho vliv na obsah TAG v játrech nebo snížení hladiny inzulinu v krvi. Děje, které se v organismu dynamicky mění, například aktivace AMPK, byly v době měření nezměněné, což může také znamenat, že metformin působil přechodně, především bezprostředně po jeho příjmu.

Slabý účinek metforminu nebyl způsoben příliš nízkými dávkami. V mnoha výše zmíněných studiích byla řada účinků metforminu pozorována již při dávce 50 mg/kg BW/den. Často užívanou dávkou v pokusech na hlodavcích je 200 mg/kg BW/den, u lidí se maximální denní dávka pohybuje okolo 50 mg/kg BW/den. Důvodem nedostatečného

účinku metforminu by tak mohl být způsob podání. Zatímco při podání léku pacientům a ve většině studií na zvířatech dochází k administraci celé dávky najednou, v tomto pokuse přijímaly myši metformin v pitné vodě po malých dávkách v průběhu celého dne. Ve výsledku tak sice požily stanovenou denní dávku metforminu, je však otázkou, zda se v krevním oběhu vytvořila dostatečně účinná koncentrace metforminu, která by vyvolala žádoucí účinky.

Souhrn

Podávání metforminu na pozadí vysokotukové diety mělo u obézních myší především značný anorexigenní účinek, který vedl ke snížení hmotnosti a následnému zlepšení některých metabolických parametrů. Tento efekt byl mnohem znatelnější u skupiny na dietě HFD, než u skupiny na dietě HSD. Benefiční účinky na velikost tukových dep, glukózovou toleranci a glykémii nalačno korelovaly především se sníženou hmotností myší. Nicméně byly pozorovány účinky, které korelovaly s podanou dávkou metforminu a nikoliv s tělesnou hmotností, jako například snížení hladiny inzulinu a zlepšení jaterní steatózy.

Mezi nedostatky tohoto pokusu lze počítat odchýlení od plánovaných dávek metforminu, které bylo způsobeno změnami v hmotnostech myší. Na konci pokusu byl však proveden výpočet skutečné dávky metforminu, který ukázal, že se výsledné dávky od plánovaných nelišily o více než 20 %, což bylo pro účely tohoto pokusu dostatečné.

Dalším nedostatkem bylo, že ani nejvyšší dávka metforminu nevyvolala všechny známé benefiční metabolické účinky, což mohlo být spojeno s jejím postupným přijímáním v průběhu celého dne. Z tohoto hlediska se jeví jako nejvhodnější aplikace celé dávky metforminu najednou gaváží nebo injekčně, což ovšem není použitelné při dlouhotrvajících pokusech. Podávání metforminu v pitné vodě umožní pravděpodobně odhalit pouze účinky, které se postupně akumulují po delší dobu. Publikované práce, které využívaly tento aplikační model, se týkaly jevů podobného charakteru, především účinků metforminu na růst nádorů¹⁷⁷.

Velkou komplikací byl dále silný anorexigenní efekt, který vyvolávaly vysoké dávky metforminu v pitné vodě. Příjem potravy se u skupiny HFD snížil v některých případech velmi výrazně. Nebylo tak možné určit, zda následné benefiční účinky byly způsobeny pouze snížením hmotnosti zvířat, nebo přímým účinkem metforminu na metabolismus. Vzhledem k tomu, že se efekt metforminu na příjem potravy lišil v závislosti na složení podávané vysokotukové diety, nebylo možné srovnávat jednotlivé experimentální skupiny mezi sebou. Pakliže byl anorexigenní účinek metforminu způsoben nechutenstvím, bylo by možné tento jev částečně omezit postupným navyšováním dávky metforminu tak, jak se tomu děje v klinické praxi při podávání léku pacientům.

Z výše uvedených dat jsme usoudili, že dlouhodobé podávání metforminu v pitné vodě není vhodným modelem pro využití v laboratorní praxi. Nelze však vyloučit, že při

jednorázovém podávání a postupném navyšování dávky metforminu u myší, které jsou chovány v samostatných klecích po jedné, by řada výše popsaných nežádoucích účinků na příjem potravy mohla být odstraněna a benefičních účinků přesto dosaženo. Model chronického podávání metforminu u obézních myší je vzhledem ke svému významu v klinické praxi stále atraktivní.

Konzumace diety HSD vede u myší k nárůstu spotřeby potravy, což indukuje intenzivnější nárůst tělesné hmotnosti a silnější rozvoj metabolických poruch, jako je dyslipidémie, nebo inzulínová rezistence. Některé faktory, například obsah TAG v játrech a v plasmě nebo hmotnost jater, naznačují, že ve srovnání s dietou HFD stimuluje dieta HSD mnohem intenzivněji jaterní lipogenezi, což se shoduje s všeobecnou představou o tom, proč zatěžují nasycené mastné kyseliny metabolismus více než kyseliny nenasycené. Glukózová tolerance se vlivem podávání diety HSD nemění, nebo je naopak vyšší než na pozadí diety HFD. Vzhledem k tomu, že inzulínová rezistence je na pozadí diety HSD oproti tomu výrazně silnější, lze usuzovat, že dieta HSD vyvolává také zvýšenou sekreci inzulínu z pankreatu.

Dieta HSD, která je založena na nasycených mastných kyselinách vepřového sádla a sacharóze, je tedy silnějším obezitogenním činidlem, než dieta HFD a je proto velmi vhodná pro využití v laboratorní praxi. Pozitivem této diety je silný lipogenní účinek, který umožní odmaskovat i slabé změny v tomto procesu, způsobené přítomností jiné experimentální látky, což jsme mohli pozorovat při srovnání účinků metforminu na pozadí obezitogenních diet HFD a HSD. Naopak negativem diety HSD je indukce hyperfágie, která komplikuje možnost porovnávání účinků experimentálních látek u zvířat krměných jinými dietami (například kontrolní nízkokalorickou dietou).

Při podávání metforminu v pitné vodě jsme nepozorovali všechny očekávané účinky tohoto léku, především aktivaci AMPK, normalizaci hladiny lipidových metabolitů v plasmě, nebo pokles glykémie nalačno. Tímto způsobem podání se zřejmě nepodařilo dosáhnout dostatečně vysoké hladiny metforminu v krvi ani při velmi vysokých koncentracích léku ve vodě, které jinak vyvolávaly silný anorexigenní efekt především na u myší krměných dietou HFD. Benefiční účinky na metabolismus byly většinou spojené se změnami v příjmu potravy a následným poklesem tělesné hmotnosti. Z přímých účinků metforminu jsme pozorovali pouze pokles obsahu TAG v játrech u skupiny HSD a snížení hladiny inzulínu u obou skupin, což jsou změny kumulativního charakteru, kterých bylo pravděpodobně možné dosáhnout i při nízkých koncentracích metforminu v krvi. Chronické podávání metforminu v pitné vodě proto není vhodným modelem pro praktické využití. Atraktivním modelem by vzhledem ke své důležitosti z hlediska klinické praxe mohla být jednorázová aplikace s postupným navyšováním dávky u myší chovaných v samostatných klecích po jedné.

1. Avram, A.S., Avram, M.M. & James, W.D. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J. Am. Acad. Dermatol* **53**, 671-683 (2005).
2. Anghel, S.I. & Wahli, W. Fat poetry: a kingdom for PPAR gamma. *Cell Res* **17**, 486-511 (2007).
3. Rosen, E.D. & Spiegelman, B.M. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* **444**, 847-853 (2006).
4. WHO | World Health Statistics 2010. v <<http://www.who.int/whosis/whostat/2010/en/index.html>>
5. Unger, R.H., Clark, G.O., Scherer, P.E. & Orci, L. Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Biochim. Biophys. Acta* **1801**, 209-214 (2010).
6. Gade, W., Schmit, J., Collins, M. & Gade, J. Beyond obesity: the diagnosis and pathophysiology of metabolic syndrome. *Clin Lab Sci* **23**, 51-61; quiz 62-65 (2010).
7. Ravussin, E. & Smith, S.R. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann. N. Y. Acad. Sci* **967**, 363-378 (2002).
8. Bjørbaek, C. Central leptin receptor action and resistance in obesity. *J. Investig. Med* **57**, 789-794 (2009).
9. Lönnqvist, F. et al. Leptin secretion from adipose tissue in women. Relationship to plasma levels and gene expression. *J. Clin. Invest* **99**, 2398-2404 (1997).
10. Morris, D.L. & Rui, L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **297**, E1247-1259 (2009).
11. Shimabukuro, M. et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 4637-4641 (1997).
12. Zhou, Y.T. et al. Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 6386-6390 (1997).
13. Lefebvre, P., Chinetti, G., Fruchart, J.-C. & Staels, B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J. Clin. Invest* **116**, 571-580 (2006).
14. Wang, M.-Y., Orci, L., Ravazzola, M. & Unger, R.H. Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**, 18011-18016 (2005).
15. Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**, 1023-1033 (2007).
16. Perseghin, G. et al. Serum retinol-binding protein-4, leptin, and adiponectin concentrations are related to ectopic fat accumulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **92**, 4883-4888 (2007).
17. Goodpaster, B.H., Thaete, F.L., Simoneau, J.A. & Kelley, D.E. Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* **46**, 1579-1585 (1997).
18. Wang, Y., Rimm, E.B., Stampfer, M.J., Willett, W.C. & Hu, F.B. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am. J. Clin. Nutr* **81**, 555-563 (2005).
19. Racette, S.B., Evans, E.M., Weiss, E.P., Hagberg, J.M. & Holloszy, J.O. Abdominal adiposity is a stronger predictor of insulin resistance than fitness among 50-95 year olds. *Diabetes Care* **29**, 673-678 (2006).
20. Björntorp, P. „Portal“ adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* **10**, 493-496 (1990).
21. Hartz, A.J., Rupley, D.C., Jr, Kalkhoff, R.D. & Rimm, A.A. Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution. *Prev Med* **12**, 351-357 (1983).
22. Montague, C.T. & O'Rahilly, S. The perils of portliness: causes and consequences of visceral adiposity. *Diabetes* **49**, 883-888 (2000).
23. Miles, J.M. & Jensen, M.D. Counterpoint: visceral adiposity is not causally related to insulin resistance. *Diabetes Care* **28**, 2326-2328 (2005).
24. Boden, G. Fatty acids and insulin resistance. *Diabetes Care* **19**, 394-395 (1996).
25. Ostman, J., Arner, P., Engfeldt, P. & Kager, L. Regional differences in the control of lipolysis in human adipose tissue. *Metab. Clin. Exp* **28**, 1198-1205 (1979).
26. Reynisdottir, S., Dauzats, M., Thörne, A. & Langin, D. Comparison of hormone-sensitive lipase activity in visceral and subcutaneous human adipose tissue. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **82**, 4162-4166 (1997).

27. Zierath, J.R. et al. Regional difference in insulin inhibition of non-esterified fatty acid release from human adipocytes: relation to insulin receptor phosphorylation and intracellular signalling through the insulin receptor substrate-1 pathway. *Diabetologia* **41**, 1343-1354 (1998).
28. Boden, G. & Shulman, G.I. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest* **32 Suppl 3**, 14-23 (2002).
29. Stefan, N. et al. Identification and characterization of metabolically benign obesity in humans. *Arch. Intern. Med* **168**, 1609-1616 (2008).
30. GORDON, E.S. Non-Esterified Fatty Acids in the Blood of Obese and Lean Subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition* **8**, 740 -747 (1960).
31. Reaven, G.M., Hollenbeck, C., Jeng, C.Y., Wu, M.S. & Chen, Y.D. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* **37**, 1020-1024 (1988).
32. Björntorp, P., Bergman, H. & Varnauskas, E. Plasma free fatty acid turnover rate in obesity. *Acta Med Scand* **185**, 351-356 (1969).
33. Jensen, M.D., Haymond, M.W., Rizza, R.A., Cryer, P.E. & Miles, J.M. Influence of body fat distribution on free fatty acid metabolism in obesity. *J. Clin. Invest* **83**, 1168-1173 (1989).
34. Abdul-Ghani, M.A. & DeFronzo, R.A. Pathogenesis of insulin resistance in skeletal muscle. *J. Biomed. Biotechnol* **2010**, 476279 (2010).
35. Belfort, R. et al. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* **54**, 1640-1648 (2005).
36. Vaag, A. et al. Effect of the antilipolytic nicotinic acid analogue acipimox on whole-body and skeletal muscle glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **88**, 1282-1290 (1991).
37. DeFronzo, R.A. & Tripathy, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **32 Suppl 2**, S157-163 (2009).
38. Kashyap, S.R. et al. Discordant effects of a chronic physiological increase in plasma FFA on insulin signaling in healthy subjects with or without a family history of type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **287**, E537-546 (2004).
39. RANDLE, P.J., GARLAND, P.B., HALES, C.N. & NEWSHOLME, E.A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1**, 785-789 (1963).
40. Roden, M. Non-invasive studies of glycogen metabolism in human skeletal muscle using nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **4**, 261-266 (2001).
41. Roden, M. How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol. Sci* **19**, 92-96 (2004).
42. Boden, G. Fuel metabolism in pregnancy and in gestational diabetes mellitus. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am* **23**, 1-10 (1996).
43. Boden, G., Lebed, B., Schatz, M., Homko, C. & Lemieux, S. Effects of acute changes of plasma free fatty acids on intramyocellular fat content and insulin resistance in healthy subjects. *Diabetes* **50**, 1612-1617 (2001).
44. Itani, S.I., Zhou, Q., Pories, W.J., MacDonald, K.G. & Dohm, G.L. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. *Diabetes* **49**, 1353-1358 (2000).
45. Corkey, B.E., Deeney, J.T., Yaney, G.C., Tornheim, K. & Prentki, M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *J. Nutr* **130**, 299S-304S (2000).
46. Boden, G., Chen, X. & Iqbal, N. Acute lowering of plasma fatty acids lowers basal insulin secretion in diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes* **47**, 1609-1612 (1998).
47. Dobbins, R.L., Chester, M.W., Daniels, M.B., McGarry, J.D. & Stein, D.T. Circulating fatty acids are essential for efficient glucose-stimulated insulin secretion after prolonged fasting in humans. *Diabetes* **47**, 1613-1618 (1998).
48. Mulder, H., Yang, S., Winzell, M.S., Holm, C. & Åhrén, B. Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* **53**, 122-128 (2004).
49. Stein, D.T. et al. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *J. Clin. Invest* **100**, 398-403 (1997).
50. Tomita, T. et al. Expression of the gene for a membrane-bound fatty acid receptor in the pancreas and islet cell tumours in humans: evidence for GPR40 expression in pancreatic beta cells and implications for insulin secretion. *Diabetologia* **49**, 962-968 (2006).
51. Steneberg, P., Rubins, N., Bartoov-Shifman, R., Walker, M.D. & Edlund, H. The FFA receptor GPR40 links hyperinsulinemia, hepatic steatosis, and impaired glucose homeostasis in mouse. *Cell Metab* **1**, 245-258 (2005).
52. Ferrannini, E., Barrett, E.J., Bevilacqua, S. & DeFronzo, R.A. Effect of fatty acids on glucose production and utilization in man. *J. Clin. Invest* **72**, 1737-1747 (1983).

53. Chen, X., Iqbal, N. & Boden, G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J. Clin. Invest* **103**, 365-372 (1999).
54. Roden, M. et al. Effects of free fatty acid elevation on postabsorptive endogenous glucose production and gluconeogenesis in humans. *Diabetes* **49**, 701-707 (2000).
55. Dey, D., Basu, D., Roy, S.S., Bandyopadhyay, A. & Bhattacharya, S. Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Mol. Cell. Endocrinol* **246**, 60-64 (2006).
56. Perry, D.K. Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochim. Biophys. Acta* **1585**, 146-152 (2002).
57. Summers, S.A. Ceramides in insulin resistance and lipotoxicity. *Prog. Lipid Res* **45**, 42-72 (2006).
58. Adams, J.M., 2nd et al. Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans. *Diabetes* **53**, 25-31 (2004).
59. Haus, J.M. et al. Plasma ceramides are elevated in obese subjects with type 2 diabetes and correlate with the severity of insulin resistance. *Diabetes* **58**, 337-343 (2009).
60. Ussher, J.R. et al. Inhibition of de novo ceramide synthesis reverses diet-induced insulin resistance and enhances whole-body oxygen consumption. *Diabetes* **59**, 2453-2464 (2010).
61. Uherková J, Pocztaková H, Rypka M & Veselý J Specifické fosforylace proteinů IRS a jejich úloha v inzulinové signalizaci. *Československá fyziologie* 22-29 (2006).
62. Summers, S.A., Garza, L.A., Zhou, H. & Birnbaum, M.J. Regulation of insulin-stimulated glucose transporter GLUT4 translocation and Akt kinase activity by ceramide. *Mol. Cell. Biol* **18**, 5457-5464 (1998).
63. Kanety, H., Hemi, R., Papa, M.Z. & Karasik, A. Sphingomyelinase and ceramide suppress insulin-induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem* **271**, 9895-9897 (1996).
64. Stratford, S., DeWald, D.B. & Summers, S.A. Ceramide dissociates 3'-phosphoinositide production from pleckstrin homology domain translocation. *Biochem. J* **354**, 359-368 (2001).
65. García-Ruiz, C., Colell, A., Mari, M., Morales, A. & Fernández-Checa, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem* **272**, 11369-11377 (1997).
66. Guduz, T.I., Tserng, K.Y. & Hoppel, C.L. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J. Biol. Chem* **272**, 24154-24158 (1997).
67. Kelley, D.E., He, J., Menshikova, E.V. & Ritov, V.B. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944-2950 (2002).
68. Ritov, V.B. et al. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**, 8-14 (2005).
69. Siskind, L.J., Kolesnick, R.N. & Colombini, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem* **277**, 26796-26803 (2002).
70. Knapp, K.M. & English, B.K. Ceramide-mediated stimulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tumor necrosis factor (TNF) accumulation in murine macrophages requires tyrosine kinase activity. *J. Leukoc. Biol* **67**, 735-741 (2000).
71. Monteiro, R. & Azevedo, I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome. *Mediators Inflamm* **2010**, (2010).
72. Maury, E. & Brichard, S.M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol* **314**, 1-16 (2010).
73. Katsuki, A. et al. Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **83**, 859-862 (1998).
74. Pickup, J.C., Chusney, G.D., Thomas, S.M. & Burt, D. Plasma interleukin-6, tumour necrosis factor α and blood cytokine production in type 2 diabetes. *Life Sci* **67**, 291-300 (2000).
75. Chen, G. & Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634-1635 (2002).
76. Cinti, S. et al. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J. Lipid Res* **46**, 2347-2355 (2005).
77. Monteiro, R., de Castro, P.M.S.T., Calhau, C. & Azevedo, I. Adipocyte size and liability to cell death. *Obes Surg* **16**, 804-806 (2006).
78. Curat, C.A. et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia* **49**, 744-747 (2006).
79. Vitseva, O.I. et al. Inducible Toll-like receptor and NF- κ B regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 932-937 (2008).

80. Suganami, T. et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF-kappaB pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* **27**, 84-91 (2007).
81. Tsukumo, D.M.L. et al. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* **56**, 1986-1998 (2007).
82. Lee, J.Y. et al. Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids: preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res* **44**, 479-486 (2003).
83. Furukawa, S. et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest* **114**, 1752-1761 (2004).
84. Lagathu, C. et al. Chronic interleukin-6 (IL-6) treatment increased IL-6 secretion and induced insulin resistance in adipocyte: prevention by rosiglitazone. *Biochem. Biophys. Res. Commun* **311**, 372-379 (2003).
85. Wurfel, M.M., Kunitake, S.T., Lichenstein, H., Kane, J.P. & Wright, S.D. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *J. Exp. Med* **180**, 1025-1035 (1994).
86. Popa, C., Netea, M.G., van Riel, P.L.C.M., van der Meer, J.W.M. & Stalenhoef, A.F.H. The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J. Lipid Res* **48**, 751-762 (2007).
87. Bulló, M. et al. TNFalpha expression of subcutaneous adipose tissue in obese and morbid obese females: relationship to adipocyte LPL activity and leptin synthesis. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord* **26**, 652-658 (2002).
88. Wu, G., Brouckaert, P. & Olivecrona, T. Rapid downregulation of adipose tissue lipoprotein lipase activity on food deprivation: evidence that TNF-alpha is involved. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* **286**, E711-717 (2004).
89. Green, A., Dobias, S.B., Walters, D.J. & Brasier, A.R. Tumor necrosis factor increases the rate of lipolysis in primary cultures of adipocytes without altering levels of hormone-sensitive lipase. *Endocrinology* **134**, 2581-2588 (1994).
90. Laurencikienė, J. et al. NF-kappaB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. *J. Lipid Res* **48**, 1069-1077 (2007).
91. Feingold, K.R. et al. Diet affects the mechanisms by which TNF stimulates hepatic triglyceride production. *Am. J. Physiol* **259**, E177-184 (1990).
92. Grunfeld, C. et al. Evidence for two classes of cytokines that stimulate hepatic lipogenesis: relationships among tumor necrosis factor, interleukin-1 and interferon-alpha. *Endocrinology* **127**, 46-54 (1990).
93. Hotamisligil, G.S. et al. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668 (1996).
94. DeFronzo, R.A., Gunnarsson, R., Björkman, O., Olsson, M. & Wahren, J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J. Clin. Invest* **76**, 149-155 (1985).
95. Kelley, D.E. & Mandarino, L.J. Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* **49**, 677-683 (2000).
96. Corpeleijn, E., Saris, W.H.M. & Blaak, E.E. Metabolic flexibility in the development of insulin resistance and type 2 diabetes: effects of lifestyle. *Obes Rev* **10**, 178-193 (2009).
97. Strålfors, P. & Honnör, R.C. Insulin-induced dephosphorylation of hormone-sensitive lipase. Correlation with lipolysis and cAMP-dependent protein kinase activity. *Eur. J. Biochem* **182**, 379-385 (1989).
98. Haystead, T.A. & Hardie, D.G. Both insulin and epidermal growth factor stimulate lipogenesis and acetyl-CoA carboxylase activity in isolated adipocytes. Importance of homogenization procedure in avoiding artefacts in acetyl-CoA carboxylase assay. *Biochem. J* **234**, 279-284 (1986).
99. Arner, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol. Metab* **14**, 137-145 (2003).
100. Duckworth, W.C., Bennett, R.G. & Hamel, F.G. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr. Rev* **19**, 608-624 (1998).
101. Uete, T. & Tsuchikura, H. Autoregulatory system of insulin degradation in liver. I. Decreased ¹³¹I-insulin degradation in the liver of insulin deficient rats. *J. Biochem* **72**, 157-163 (1972).
102. Jeng, C.Y., Sheu, W.H., Fuh, M.M., Chen, Y.D. & Reaven, G.M. Relationship between hepatic glucose production and fasting plasma glucose concentration in patients with NIDDM. *Diabetes* **43**, 1440-1444 (1994).
103. Müller, M.J., Möring, J. & Seitz, H.J. Regulation of hepatic glucose output by glucose in vivo. *Metab. Clin. Exp* **37**, 55-60 (1988).
104. Michael, M. Loss of Insulin Signaling in Hepatocytes Leads to Severe Insulin Resistance and Progressive Hepatic Dysfunction. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 87-97 (2000).doi:10.1016/S1097-2765(05)00015-8

105. Farris, W. et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 4162-4167 (2003).
106. Harbeck, M.C., Louie, D.C., Howland, J., Wolf, B.A. & Rothenberg, P.L. Expression of insulin receptor mRNA and insulin receptor substrate 1 in pancreatic islet beta-cells. *Diabetes* **45**, 711-717 (1996).
107. Kulkarni, R.N. et al. Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell* **96**, 329-339 (1999).
108. Curry, D.L., Bennett, L.L. & Grodsky, G.M. Dynamics of insulin secretion by the perfused rat pancreas. *Endocrinology* **83**, 572-584 (1968).
109. Berthoud, H.R., Bereiter, D.A., Trimble, E.R., Siegel, E.G. & Jeanrenaud, B. Cephalic phase, reflex insulin secretion. Neuroanatomical and physiological characterization. *Diabetologia* **20 Suppl**, 393-401 (1981).
110. Bruce, D.G., Chisholm, D.J., Storlien, L.H. & Kraegen, E.W. Physiological importance of deficiency in early prandial insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* **37**, 736-744 (1988).
111. Brunzell, J.D. et al. Relationships between fasting plasma glucose levels and insulin secretion during intravenous glucose tolerance tests. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **42**, 222-229 (1976).
112. Reaven, G.M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595-1607 (1988).
113. Kaplan, N.M. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch. Intern. Med* **149**, 1514-1520 (1989).
114. Chanson, P. & Salenave, S. Metabolic syndrome in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* **92 Suppl 1**, 96-101 (2010).
115. Bruce, K.D. & Hanson, M.A. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J. Nutr* **140**, 648-652 (2010).
116. Igor Karen & Miroslav Souček Metabolický syndrom - diagnostika a léčba. (2007).
117. Yki-Järvinen, H. Ectopic fat accumulation: an important cause of insulin resistance in humans. *J R Soc Med* **95 Suppl 42**, 39-45 (2002).
118. Monetti, M. et al. Dissociation of hepatic steatosis and insulin resistance in mice overexpressing DGAT in the liver. *Cell Metab* **6**, 69-78 (2007).
119. Postic, C. & Girard, J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J. Clin. Invest* **118**, 829-838 (2008).
120. Begriche, K., Igoudjil, A., Pessayre, D. & Fromenty, B. Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* **6**, 1-28 (2006).
121. Yamaguchi, K. et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* **45**, 1366-1374 (2007).
122. Listenberger, L.L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **100**, 3077-3082 (2003).
123. Stumvoll, M., Goldstein, B.J. & van Haeften, T.W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **365**, 1333-1346 (2005).
124. Atkinson, M.A. & Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* **358**, 221-229 (2001).
125. Matthews, D.R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **28**, 412-419 (1985).
126. Kirpichnikov, D., McFarlane, S.I. & Sowers, J.R. Metformin: an update. *Ann. Intern. Med* **137**, 25-33 (2002).
127. Bosi, E. Metformin--the gold standard in type 2 diabetes: what does the evidence tell us? *Diabetes Obes Metab* **11 Suppl 2**, 3-8 (2009).
128. Bailey, C. & Day, C. Metformin: its botanical background. *Pract Diab Int* **21**, 115-117 (2004).
129. Marchetti, P. et al. Pancreatic islets from type 2 diabetic patients have functional defects and increased apoptosis that are ameliorated by metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **89**, 5535-5541 (2004).
130. Katsiki, N., Georgiadou, E. & Hatzitolios, A.I. The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome. *Drugs* **69**, 1417-1431 (2009).
131. Jalving, M. et al. Metformin: taking away the candy for cancer? *Eur. J. Cancer* **46**, 2369-2380 (2010).
132. Holstein, A. & Stumvoll, M. Contraindications can damage your health--is metformin a case in point? *Diabetologia* **48**, 2454-2459 (2005).

133. Wang, D.-S. et al. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. *J. Pharmacol. Exp. Ther* **302**, 510-515 (2002).
134. Dresser, M.J., Xiao, G., Leabman, M.K., Gray, A.T. & Giacomini, K.M. Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). *Pharm. Res* **19**, 1244-1247 (2002).
135. Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest* **108**, 1167-1174 (2001).
136. Hawley, S.A., Gadalla, A.E., Olsen, G.S. & Hardie, D.G. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes* **51**, 2420-2425 (2002).
137. Foretz, M. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest* **120**, 2355-2369 (2010).
138. Ouyang, J., Parakhia, R.A. & Ochs, R.S. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J. Biol. Chem* **286**, 1-11 (2011).
139. Lalau, J.-D. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf* **33**, 727-740 (2010).
140. Owen, M.R., Doran, E. & Halestrap, A.P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem. J* **348 Pt 3**, 607-614 (2000).
141. Lim, C.T., Kola, B. & Korbonits, M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J. Mol. Endocrinol* **44**, 87-97 (2010).
142. Lage, R., Diéguez, C., Vidal-Puig, A. & López, M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med* **14**, 539-549 (2008).
143. Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T. & Hardie, D.G. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS Lett* **377**, 421-425 (1995).
144. Corton, J.M., Gillespie, J.G., Hawley, S.A. & Hardie, D.G. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem* **229**, 558-565 (1995).
145. Miller, R.A. & Birnbaum, M.J. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J. Clin. Invest* **120**, 2267-2270 (2010).
146. Large, V. & Beylot, M. Modifications of citric acid cycle activity and gluconeogenesis in streptozotocin-induced diabetes and effects of metformin. *Diabetes* **48**, 1251-1257 (1999).
147. Radziuk, J., Zhang, Z., Wiernsperger, N. & Pye, S. Effects of metformin on lactate uptake and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Diabetes* **46**, 1406-1413 (1997).
148. Shaw, R.J. et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* **310**, 1642-1646 (2005).
149. Dentin, R., Hedrick, S., Xie, J., Yates, J., 3rd & Montminy, M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science* **319**, 1402-1405 (2008).
150. He, L. et al. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell* **137**, 635-646 (2009).
151. Kim, Y.D. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP. *Diabetes* **57**, 306-314 (2008).
152. Boyle, J.G., Salt, I.P. & McKay, G.A. Metformin action on AMP-activated protein kinase: a translational research approach to understanding a potential new therapeutic target. *Diabet. Med* **27**, 1097-1106 (2010).
153. Musi, N. et al. Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2074-2081 (2002).
154. Kumar, N. & Dey, C.S. Metformin enhances insulin signalling in insulin-dependent and-independent pathways in insulin resistant muscle cells. *Br. J. Pharmacol* **137**, 329-336 (2002).
155. Gunton, J.E., Delhanty, P.J.D., Takahashi, S.-I. & Baxter, R.C. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **88**, 1323-1332 (2003).
156. Lee, J.O. et al. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J. Cell. Physiol* **226**, 974-981 (2011).
157. Henin, N., Vincent, M.F., Gruber, H.E. & Van den Berghe, G. Inhibition of fatty acid and cholesterol synthesis by stimulation of AMP-activated protein kinase. *FASEB J* **9**, 541-546 (1995).
158. Park, H. et al. Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise. *J. Biol. Chem* **277**, 32571-32577 (2002).
159. Park, S.H. et al. Phosphorylation-activity relationships of AMPK and acetyl-CoA carboxylase in muscle. *J. Appl. Physiol* **92**, 2475-2482 (2002).

160. Foretz, M., Carling, D., Guichard, C., Ferré, P. & Foufelle, F. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem* **273**, 14767-14771 (1998).
161. Saha, A.K. et al. Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside. *J. Biol. Chem* **275**, 24279-24283 (2000).
162. McGarry, J.D. & Brown, N.F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. *Eur. J. Biochem* **244**, 1-14 (1997).
163. Monzillo, L.U. & Hamdy, O. Evaluation of insulin sensitivity in clinical practice and in research settings. *Nutr. Rev* **61**, 397-412 (2003).
164. Smith, P.K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem* **150**, 76-85 (1985).
165. Fabbrini, E., Sullivan, S. & Klein, S. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications. *Hepatology* **51**, 679-689 (2010).
166. Lin, J. et al. Hyperlipidemic effects of dietary saturated fats mediated through PGC-1beta coactivation of SREBP. *Cell* **120**, 261-273 (2005).
167. Sampath, H., Miyazaki, M., Dobrzyn, A. & Ntambi, J.M. Stearoyl-CoA desaturase-1 mediates the pro-lipogenic effects of dietary saturated fat. *J. Biol. Chem* **282**, 2483-2493 (2007).
168. Horton, J.D., Goldstein, J.L. & Brown, M.S. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest* **109**, 1125-1131 (2002).
169. Leyton, J., Drury, P.J. & Crawford, M.A. Differential oxidation of saturated and unsaturated fatty acids in vivo in the rat. *Br. J. Nutr* **57**, 383-393 (1987).
170. DeLany, J.P., Windhauser, M.M., Champagne, C.M. & Bray, G.A. Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am. J. Clin. Nutr* **72**, 905-911 (2000).
171. Schaefer, E.J., Gleason, J.A. & Dansinger, M.L. Dietary fructose and glucose differentially affect lipid and glucose homeostasis. *J. Nutr* **139**, 1257S-1262S (2009).
172. Faeh, D. et al. Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* **54**, 1907-1913 (2005).
173. Waters, K.M. & Ntambi, J.M. Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice. *J. Biol. Chem* **269**, 27773-27777 (1994).
174. Bachmanov, A.A., Tordoff, M.G. & Beauchamp, G.K. Sweetener preference of C57BL/6ByJ and 129P3/J mice. *Chem. Senses* **26**, 905-913 (2001).
175. Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L.C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* **15**, 798-808 (2007).
176. Rouru, J., Huupponen, R., Pesonen, U. & Koulou, M. Subchronic treatment with metformin produces anorectic effect and reduces hyperinsulinemia in genetically obese Zucker rats. *Life Sci* **50**, 1813-1820 (1992).
177. Anisimov, V.N. et al. Metformin extends life span of HER-2/neu transgenic mice and in combination with melatonin inhibits growth of transplantable tumors in vivo. *Cell Cycle* **9**, 188-197 (2010).
178. Ma, T.C. et al. Metformin therapy in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Neurosci. Lett* **411**, 98-103 (2007).
179. Aubert, G., Mansuy, V., Voirol, M.-J., Pellerin, L. & Pralong, F.P. The anorexigenic effects of metformin involve increases in hypothalamic leptin receptor expression. *Metab. Clin. Exp* **60**, 327-334 (2011).